

ORSTOM  
CENTRE DE CAYENNE

INSTITUT PASTEUR  
DE GUYANE FRANÇAISE

RECHERCHE DE SUBSTANCES  
NATURELLES A ACTIVITES  
ANTIPALUDIQUE  
ET ANTILEISHMANIENNE

Dr. SAUVAIN M.  
Chargé de Recherche à l'ORSTOM

Dr DEDET J.-P.  
Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur

*Convention entre le Conseil Régional de la Guyane d'une part  
et l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération  
(ORSTOM) et l'Institut Pasteur de Guyane française d'autre part.*

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	2
1. LES MALADIES	4
1.1. <b>Paludisme</b>	5
1.1.1. Cycle des <i>Plasmodium</i>	5
1.1.2. Le paludisme dans le monde	6
1.1.3. Particularités du paludisme en Guyane	8
1.1.4. La lutte antipaludique	9
1.2. <b>Leishmanioses</b>	29
1.2.1. Principaux syndromes	29
1.2.2. Ecologie de la leishmaniose en Guyane	31
1.2.3. La chimiothérapie antileishmanienne	32
2. PROTOCOLE DE RECHERCHE A BASE D'ETHNOPHARMACOLOGIE SUR DES PLANTES MEDICINALES ANTIPARASITAIRES DES GUYANES	50
2.1. <b>Inventaire des plantes médicinales</b>	51
2.1.1. Ethnopharmacologie guyanaise	52
2.1.2. La récolte et l'identification botanique des plantes	60
2.2. <b>Tests biologiques de mise en évidence des activités dans des extraits de plantes</b>	62
2.2.1. Mise en évidence d'une activité antipaludique	62
2.2.2. Mise en évidence d'une activité antileishmanienne	65
2.3. <b>Fractionnement des plantes par guidage biologique</b>	76
2.3.1. Critères de sélection des plantes	76
2.3.2. Principe des fractionnements	76
2.4. <b>Identification des principes actifs et extensions</b>	79
2.4.1. Essais sur des analogues	79
2.4.2. Pistes chimiotaxonomiques à suivre en fonction de la classe chimique du composé actif isolé	79
2.5. <b>Confirmation d'activité <i>in vivo</i></b>	80
3. RESULTATS OBTENUS	81
3.1. <b>Substances naturelles à activité antipaludique</b>	82
3.1.1. Inventaire des plantes fébrifuges de Guyane Française et du Surinam	82
3.1.2. Les bois de litières des singes écureuils ( <i>Saimiri sciureus</i> )	84

3.1.3. Triage <i>in vitro</i> sur <i>Plasmodium falciparum</i> : sélection des plantes à étudier	86
3.1.4. Fractionnement par guidage biologique des plantes sélectionnées	89
3.1.5. Activité des molécules et des extraits isolés sur <i>Plasmodium berghei</i> infectant la souris	96
3.2. <b>Substances naturelles à activité antileishmanienne</b>	101
3.2.1. Inventaire des plantes présumées antileishmaniennes de Guyane Française et du Surinam	101
3.2.2. Criblage sur <i>Leishmania mexicana amazonensis in vitro</i>	101
3.2.3. Fractionnement des plantes sélectionnées par guidage biologique	103
3.2.4. Structures et activités des composés isolés de <i>Faramea guianensis</i> (Aublet) Bremek	109
3.2.5. Structures et activités des composés isolés de <i>Doliocarpus dentatus</i> (Aublet) Standley	113
3.2.6. Structures et activités des composés isolés de <i>Jacaranda copaia</i> (Aublet) G. Don	122
4. CONCLUSION	132
5. PARTIE EXPERIMENTALE	135
5.1. <b>Chimie</b>	136
5.1.1. Appareillage	136
5.1.2. Préparation des extraits pour le criblage préliminaire	137
5.1.3. <i>Andira coriacea</i>	138
5.1.4. <i>Faramea guianensis</i>	143
5.1.5. <i>Doliocarpus dentatus</i>	147
5.1.6. <i>Jacaranda copaia</i>	153
5.2. <b>Biologie</b>	157
5.2.1. Tests réalisés à l'Institut Pasteur de Cayenne	157
5.2.2. Tests réalisés à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry	166
5.2.3. Résultats des essais sur le paludisme expérimental des rongeurs	172
5.2.4. Résultats du criblage antileishmanien <i>in vitro</i>	176
5.2.5. Résultats des essais antileishmaniens <i>in vitro</i> sur les fractions séparées	181
6. BIBLIOGRAPHIE	193

**Nous tenons à remercier vivement :**

Messieurs les Professeurs **Philippe Gayral** et **Jacques Poisson**, monsieur **Jean-Charles Gantier**, maître de conférence et **Madame Nicole Kunesch**, directeur de Recherche au CNRS pour leurs collaborations dans le cadre de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry (Université Paris-Sud).

Les ingénieurs, techniciens et étudiants de l'Institut Pasteur de Cayenne, du centre ORSTOM de Cayenne et de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry qui à un titre ou à un autre, ont participé au programme de recherche dont ce rapport est l'une des expressions, en particulier: **Madame Françoise Gay**, **Madame Marina Guerrin**, **Mademoiselle Christine Hervy**, **Messieurs Saint-Just Bergrave**, **Jean-François Kodjoed**, **Olivier Bonnevie** et **Thierry Fandeur**.

Les informateurs sur la médecine traditionnelle des Guyanes, en particulier **Monsieur Stéva Galimo**, sans lesquels ce travail n'aurait pas existé.

Messieurs **Jean Tissandier** et **Jean Michotte**, successivement directeurs du centre ORSTOM de Cayenne et **Monsieur Yves Robin**, ancien directeur de l'Institut Pasteur de Cayenne qui nous ont toujours assuré de leurs soutiens matériel et moral.

Les botanistes du centre ORSTOM de Cayenne et de l'Université du Surinam qui nous ont aidé dans nos récoltes et déterminations botaniques : **Madame Marga Wherkhöve**, **Mademoiselle Marie-Françoise Prévost**, **Messieurs Jean-Jacques de Granville**, **Georges Crémers**, **Christian Feuillet**, **Daniel Sabatier** et **Michel Hoff**.

**Madame Diane Vernon**, anthropologue, qui a éclairé de ses connaissances ethnomédicales notre inventaire des plantes antiparasitaires des Noirs Marrons.

Notre collègue **Pierre Grenand**, anthropologue à l'ORSTOM, qui nous a conseillé dans nos enquêtes ethnobotaniques.

**Monsieur Michel Rabinovitch**, chef de laboratoire et son étudiante **Madame Claude Ramazeilles** de l'Institut Pasteur de Paris qui nous ont transmis des techniques d'essais sur la leishmaniose.

**Monsieur le Professeur Michel Koch** et son équipe pour la réalisation des essais antitumoraux.

**Monsieur Gerhard Kunesch**, directeur de recherche au CNRS qui nous a confié des échantillons d'acétate de benzoquinones.

Les services de RMN :

- du laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires du Collège de France,
  - de l'I.C.M.O., Faculté des Sciences d'Orsay de l'Université Paris-Sud,
  - du LASIR, Centre de Recherche du CNRS de Thiais
- qui ont mis respectivement à notre disposition leur appareil BRUKER AM 200, BRUKER AM250 et BRUKER AM300.

**Monsieur B.C. Das**, Directeur de Recherche au CNRS, ainsi que le service de Spectrométrie de Masse de l'ICSN de Gif sur Yvette pour l'enregistrement de certains spectres de masse

Nous adressons également nos sincères remerciements à nos collègues des laboratoires de Chimie et de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry qui, à des titres divers, ont participé à la réalisation de ce travail.

## INTRODUCTION

Dans le cadre des recherches menées par l'ORSTOM et l'Institut Pasteur en vue de l'amélioration de la santé des populations du monde tropical, nous avons entrepris un programme de recherche sur les substances naturelles présumées antiparasitaires (contre le paludisme et la leishmaniose) extraites de plantes utilisées en médecine traditionnelle dans une région amazonienne, le plateau des Guyanes.

Ce programme s'est déroulé pour sa plus grande part (1984-1987) en Guyane française, où ont été réalisées la parasitologie dans le laboratoire d'Immunologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Cayenne dirigé par Jean-Pierre Dedet et l'ethnobotanique et la chimie dans le laboratoire d'Ethnopharmacologie et de Chimie des Substances Naturelles du centre ORSTOM de Cayenne dirigé par Michel Sauvain. La seconde partie du travail s'est déroulée à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry dans le laboratoire de Chimie des Substances Thérapeutiques Naturelles du Professeur Jacques Poisson et dans le laboratoire de Parasitologie du Professeur Philippe Gayral (1988-1989).

Ce travail veut être une contribution à la rationalisation de la connaissance traditionnelle sur les plantes médicinales en vue de l'intégration de ce savoir populaire dans les systèmes de santé des pays en voie de développement. Notre recherche est guidée dans son principe par la résolution de l'OMS : "La santé pour tous en l'an 2000"<sup>1,2</sup>.

Nous présenterons dans la première partie de ce travail, les deux grandes endémies parasitaires qui sont l'objet de notre étude. Des notions succinctes d'épidémiologie permettront de comprendre comment peut être abordée la recherche d'antiparasitaires d'origine naturelle. Une revue des principales classes d'antiparasitaires actifs sur ces maladies sera précisée. L'apparition d'outils nouveaux d'évaluation des activités

antiparasitaires avec le développement de la biologie moléculaire, la recherche d'activité de substances naturelles extraites de plantes, l'origine populaire de l'information sur les plantes médicinales présumées antiparasitaires (définition de la démarche ethnopharmacologique), exigent la mise au point d'une stratégie technique particulière.

Nous avons ainsi essayé de contribuer à cette évaluation de l'activité pharmacologique de substances naturelles antiparasitaires par une approche méthodologique qui sera explicitée dans la deuxième partie. A travers l'étude ethnobotanique que nous avons poursuivie auprès de certaines populations de Guyane et du Surinam pendant quatre ans, sera développée en particulier la problématique du recueil des données sur les plantes médicinales.

Enfin dans un troisième chapitre, seront présentés les résultats des études effectuées sur les plantes présumées antiparasitaires sélectionnées à partir des pharmacopées traditionnelles des populations du plateau des Guyanes.

# 1. LES MALADIES

## 1.1. PALUDISME

Le paludisme ( palus = marais en latin), érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium* appartenant à la famille des sporozoaires et transmis par un moustique du genre *Anopheles* touche un tiers de l'Humanité vivant dans la zone intertropicale (nombre de cas déclarés à l'OMS : 100 millions par an ; mortalité probablement sous-estimée à 2 millions de morts par an dont la moitié d'enfants).

Le paludisme est responsable de symptomatologies variées dont le principal signe est la fièvre intermittente. Elle est liée aux cycles de schizogonie intraérythrocytaire suivis de l'éclatement des hématies et la libération en masse du pigment malarique ou hémozoïne. Ce produit de dégradation parasitaire de l'hémoglobine est à l'origine d'un choc thermique accompagné de violents maux de têtes, avec une sudation intense à la fin de l'épisode fébrile. Une splénomégalie et une anémie importante accompagnent les fièvres intermittentes après plusieurs cycles de lyse du parasite. Le tableau clinique est superposable pour les quatre espèces de *Plasmodium* responsables des paludismes humains (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*). Seul *P. falciparum* donne des accès pernicioeux ou neuropaludismes qui sont responsables de la mort des individus soit immunodéprimés soit non protégés par une immunité acquise (nourrissons, voyageurs occidentaux, etc...)³.

### 1.1.1. Cycle des Plasmodium

Le cycle des *Plasmodium* représenté sur le schéma N°1 comprend trois étapes, dont deux se déroulent exclusivement chez l'homme alors que la troisième commence dans l'organisme humain mais ne peut se poursuivre que chez l'anophèle femelle, vecteur exclusif du paludisme de l'homme³.

a/ cycle chez l'homme

Le cycle chez l'homme comporte deux étapes qui sont toutes les deux des multiplications asexuées ou schizogonies. La première se déroule dans les hépatocytes (schizogonie exo-érythrocytaire) et la seconde dans les hématies (schizogonie érythrocytaire).

\* Cycle exo-érythrocytaire

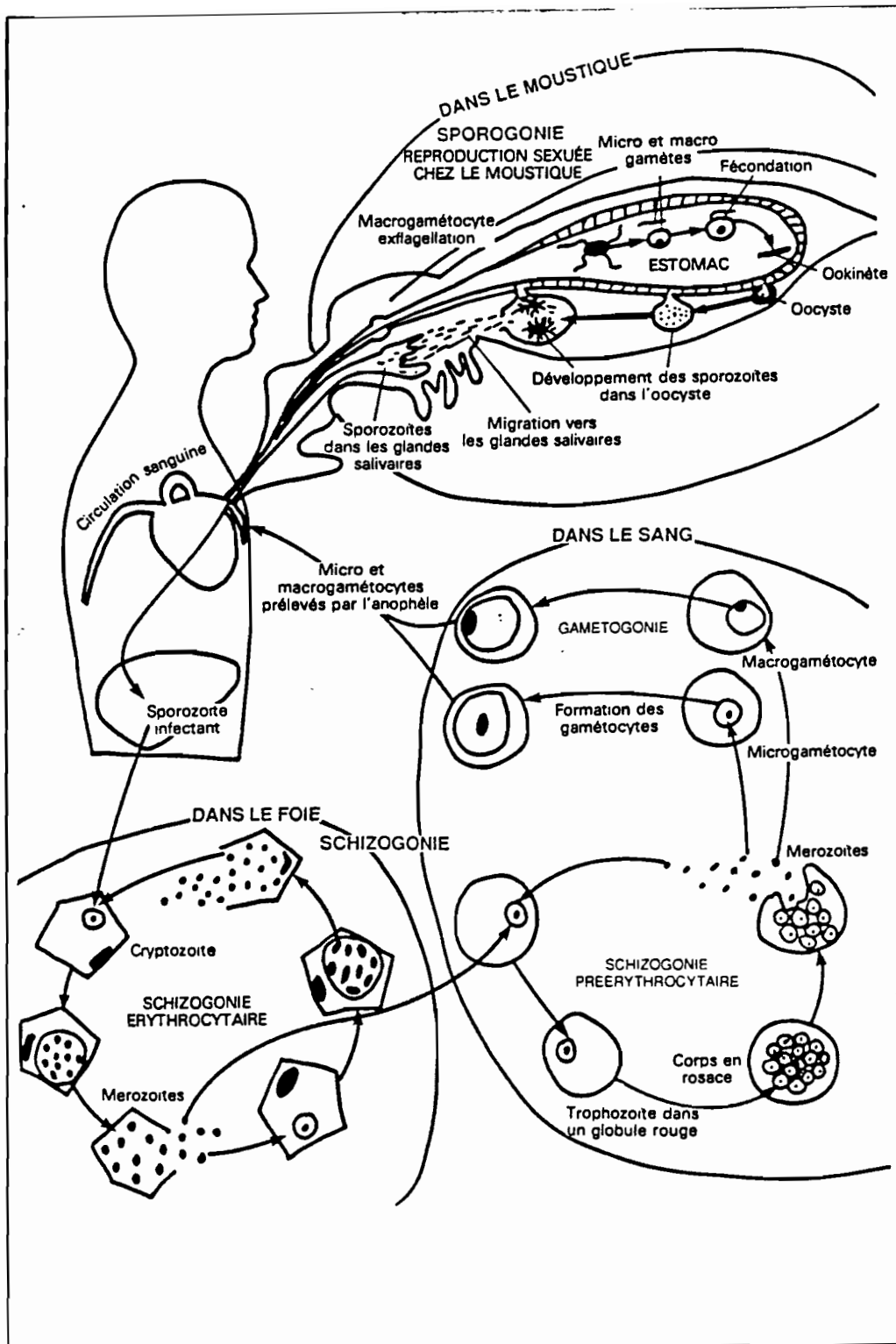


Schéma N°1 : Cycle du paludisme humain d'après "Santé et Médecine",  
Ed. La Découverte / I.N.S.E.R.M. / ORSTOM.

L'infestation est réalisée par la piqûre d'un anophèle femelle qui à l'occasion d'un repas de sang effectué chez l'homme, injecte avec sa salive les formes infestantes : les sporozoïtes. Ceux-ci gagnent rapidement les cellules hépatiques. Une série de divisions nucléaires assure la formation des schizontes exoérythrocytaires. Lorsque le schizonte est mûr, chaque noyau est devenu un mérozoïte. L'hépatocyte éclate et libère les mérozoïtes dans le courant sanguin. Il y aurait deux populations de sporozoïtes, les uns évoluant jusqu'au stade mérozoïte intraérythrocytaire et les autres restant quiescents dans les hépatocytes : on les nomme hypnozoïtes (cryptozoïtes). Les hypnozoïtes n'ont été décrits que pour *P. vivax* et pour *P. ovale* et expliqueraient les rechutes dues à ces parasites plusieurs mois voir plusieurs années après l'infestation et les premières crises. Ce cycle de 10 à 18 jours correspond à la phase d'incubation de la maladie.

#### \* Cycle érythrocytaire

Les mérozoïtes provenant du foie pénètrent à l'intérieur des érythrocytes et ils se transforment en stade annulaire ou trophozoïtes qui métabolisent le contenu de l'hématie; l'hémoglobine est remplacée progressivement par les pigments malariques ou hémozoïne. Le trophozoïte devient un schizonte multinucléé. L'hématie parasitée éclate, les mérozoïtes sont libérés et le pigment se déverse dans le sang. C'est alors que se déclenche l'accès palustre. Après plusieurs cycles schizogoniques érythrocytaires, les gamétocytes apparaissent, formes sexuées mâles et femelles qui attendent la piqûre de l'anophèle pour poursuivre le cycle

#### b/ Cycle sexué chez l'anophèle

En prenant son repas sanguin chez une personne impaludée, l'anophèle femelle ingère toutes les formes présentes dans le sang du malade. Seuls les gamétocytes survivront pour se transformer dans le tube digestif en gamètes et assurer la fécondation qui donne un oocinète. Celui-ci assure une multiplication interne en sporozoïtes qui par éclatement de l'oeuf seront libérés et gagneront les glandes salivaires du moustique.

### 1.1.2. Le paludisme dans le monde

Devant l'importance de cette endémie parasitaire, l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) créée en 1946, a lancé en 1957 un programme très ambitieux d'éradication de cette maladie. Ce programme reposait sur une stratégie à deux niveaux :

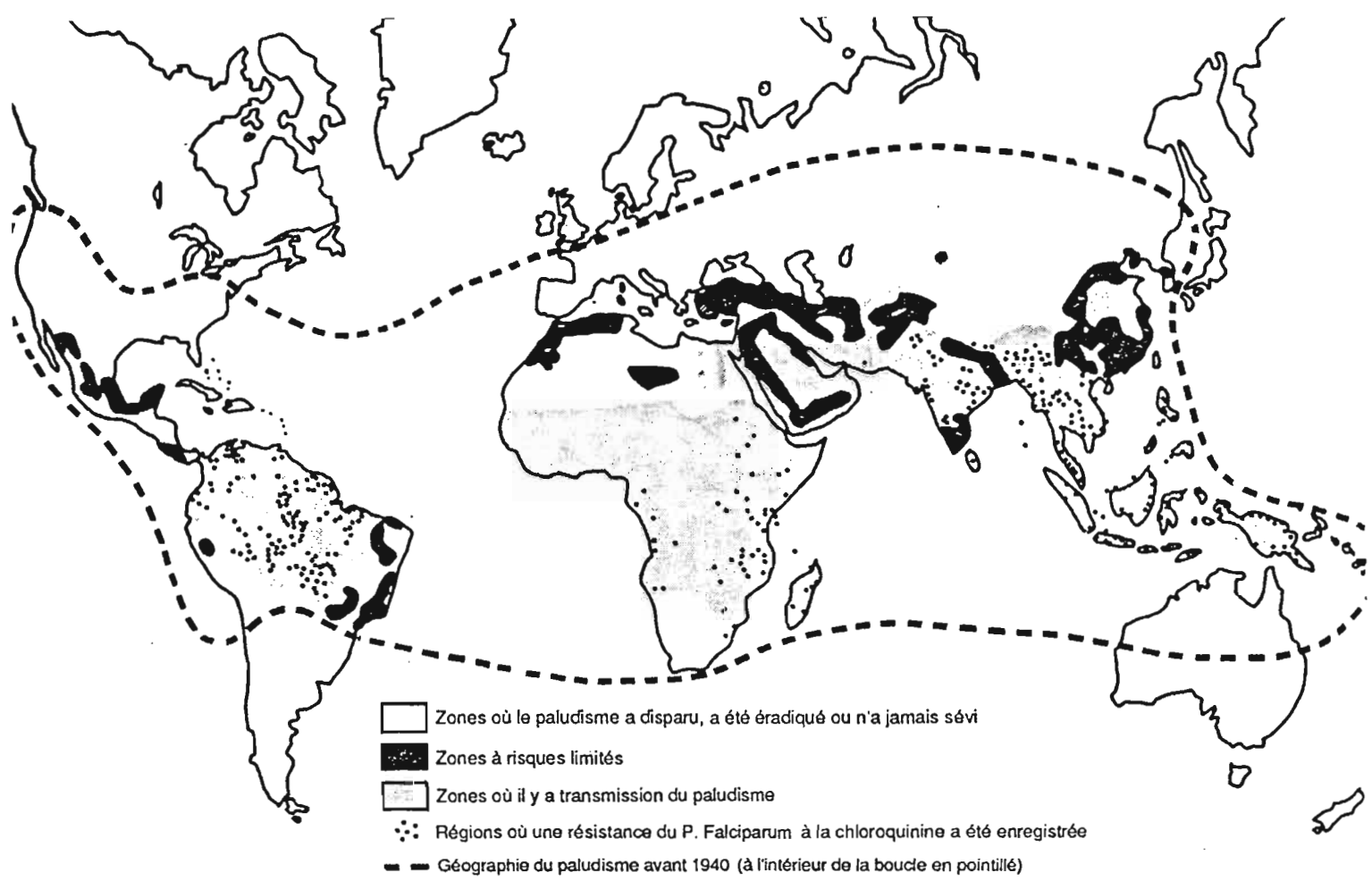


Figure N°1 : Carte épidémiologique du paludisme d'après "Santé et Médecine", Ed. La Découverte / I.N.S.E.R.M. / ORSTOM.

- \* élimination des insectes vecteurs ( les anophèles) après la découverte en 1939 du 4,4'-dichloro-diphényl-trichloroéthane plus connu sous le nom de D.D.T., insecticide organo-chloré de contact, considéré à l'époque comme répondant aux critères de l'insecticide idéal <sup>4</sup>,
- \* chimioprophylaxie collective et de masse à base de chloroquine, amino-4-quinoléine très efficace, peu toxique et peu coûteuse.

Des progrès considérables furent accomplis en quelques années. Mais les résistances des moustiques aux insecticides et les résistances des parasites aux principaux antipaludiques ont rendu caduc ce programme. La situation s'est dégradée pour les pays de la ceinture tropicale depuis les années soixante-dix, date de l'apparition des premiers foyers sérieux de résistance aux antimalariques. La carte épidémiologique du paludisme présentée ici (figure N°1) illustre la présence de la maladie dans le monde sans indication sur l'importance de sa prévalence<sup>5</sup>.

Une stratégie plus réaliste de contrôle du paludisme prévaut actuellement à l'OMS. L'OMS à travers des programmes spéciaux, le TDR (Tropical Diseases Research), soutient des recherches en chimiothérapie avec accent mis sur la pharmacovigilance pour évaluer le phénomène de résistance aux principaux antipaludiques sur le terrain. Elle préconise l'évaluation de nouveaux insecticides et larvicides spécifiques et peu toxiques pour l'environnement comme la protéine de *Bacillus thuringiensis* et la mise au point de vaccins. Toutefois, l'élément d'ordre socio-économique reste peu pris en compte : l'affaiblissement depuis la décolonisation des systèmes de santé des pays du tiers monde, seuls véritablement touchés par les maladies parasitaires, rend difficile voire impossible toute stratégie à l'échelle mondiale. La part de la santé par habitant dans le PNB de la plupart des pays de la ceinture tropicale n'arrête pas de baisser. Cette part est de 1 à 10 \$ par an par habitant dans la plupart des pays d'Afrique<sup>6</sup> à comparer avec, par exemple, le prix d'un traitement curatif à la méfloquine qui est de 10 \$. La surpopulation et la fuite des cerveaux vers les pays occidentaux renforcent cet aspect d'abandon et de délabrement du système de santé des pays tropicaux<sup>7</sup>. L'intégration des savoirs traditionnels dans une pharmacognosie locale, contribution à l'édification de pharmacopées nationales, pourrait palier en partie cette carence et permettre de créer une industrie locale du médicament répondant aux besoins immédiats en santé des populations les plus démunies du globe.

### 1.1.3. Particularités du paludisme en Guyane

L'agent principal du paludisme en Guyane est *P. falciparum* avec des foyers à *P. vivax* sur le fleuve Oyapock à la frontière du Brésil<sup>8</sup>. Le paludisme en Guyane est connu dans son aspect symptomatique depuis le début du XVIII<sup>e</sup> siècle. Le chevalier de Milhau en 1702 d'après le Dr Sausse<sup>9</sup> écrit : "... Il n'en est pas de même des fièvres continues ou intermittentes, elles y sont très fâcheuses et l'on n'y apporte pas remède promptement... ". Toujours d'après Sausse, on remarqua à l'époque la recrudescence de ces fièvres intermittentes au début de la saison sèche; mais personne ne fit le rapprochement avec la pullulation des anophèles en cette même saison. Le paludisme fut avec la fièvre jaune responsable d'une importante mortalité dans les populations des colons et plus tard des transportés du bague. Ceci pourrait expliquer en partie l'échec des tentatives de colonisation de la Guyane. Les syndromes de ces deux maladies ont été certainement confondus par les populations jusqu'à leur différenciation scientifique et donc traitées de la même façon. Toutefois, le caractère épidémique de la fièvre jaune dû à l'immunité durable acquise après une primo-infection, sa transmission par un moustique très anthropophile *Aedes aegypti* vivant dans des collections d'eaux stagnantes entretenues toute l'année par l'homme (récipients par exemple), la différencie nettement du paludisme. La larve du vecteur principal de celui-ci en Guyane, *Anopheles darlingii* est plus fragile avec un habitat plus sélectif et une période de pullulation à la fin de la saison des pluies correspondant à l'apparition de collections d'eaux naturelles calmes comme les réceptacles végétaux des Broméliacées épiphytes de la canopée<sup>10</sup> ou des jacinthes d'eau (*Eichornia crassipes*)<sup>11</sup> flottant sur les bras interrompus des fleuves. D'autre part l'immunité acquise est plus faible, moins durable. C'est pourquoi les populations amérindiennes tribales se caractérisaient toutes par une hépatosplénomégalie caractéristique des atteintes paludéennes<sup>9</sup> avant l'introduction de chimiothérapies systématiques. Après une accalmie d'une trentaine d'années, une importante recrudescence du paludisme a été observée depuis 1970 en Guyane<sup>12</sup> avec une multiplication progressive des cas enregistrés et une véritable explosion ces dernières années. Les paludologues expliquent cette situation de différentes manières et deux raisons principales ont été avancées dont les importances respectives sont mal évaluées :

- la résistance des parasites à la chloroquine, résistance de type R2 de 22% des sujets pour

lesquels un test de chimiosensibilité a pu être effectué<sup>11</sup>,

- les migrations de populations fortement impaludées en provenance de régions voisines de la Guyane comme la région du Para au Brésil<sup>12</sup> où la prévalence du paludisme est importante ainsi que de régions où la surveillance épidémiologique et la lutte se sont considérablement dégradées du fait des conditions économiques des pays concernés, le Surinam<sup>13</sup> et le Guyana<sup>14</sup>.

#### **1.1.4. La lutte antipaludique**

##### **1.1.4.1. Chimiothérapie**

###### **1.1.4.1.1. Les modèles d'évaluation de l'activité antipaludique**

Les antipaludiques sont soumis à quatre phases de sélection suivant les recommandations de l'OMS<sup>15</sup> :

- \* Une sélection primaire qui a pour but de trier entre des centaines de composés, ceux qui possèdent un effet sur les parasites du paludisme. Cette sélection doit mettre en œuvre des tests de courte durée permettant de trier rapidement beaucoup de molécules. Des tests *in vitro* et *in vivo* ont été développés dans cette perspective.
- \* Une sélection secondaire à partir de l'efficacité de molécules sélectionnées en première phase détermine les limites de l'efficacité du composé, sa toxicité... On examine l'intérêt de molécules voisines dans la même série chimique.
- \* La sélection tertiaire, étape importante avant les essais cliniques chez l'homme tente de déterminer si la molécule retenue est au moins aussi intéressante que les molécules déjà existantes : moindre toxicité pour une activité semblable, spectre d'activité sur les étapes du cycle du parasite, activité sur des souches résistantes.
- \* Enfin, les essais thérapeutiques chez l'homme qui sont semblables à ceux d'autres classes de médicaments avec détermination de l'effet thérapeutique, mesure de la tolérance et des effets secondaires, évaluation de la toxicité du produit sous ses différents aspects, pharmacocinétique de la molécule, détermination de la posologie et de la forme galénique.

Notre étude qui se situe dans la première phase de cette recherche de composés antiparasitaires, s'arrêtera à l'utilisation de modèles permettant une sélection primaire des molécules susceptibles de faire l'objet ensuite de travaux approfondis.

#### 1.1.4.1.1.1. Modèle *in vitro* : *Plasmodium falciparum*

Les tests *in vitro* utilisent actuellement les cultures continues de *Plasmodium*, parasites de l'homme. Les premières cultures continues furent mises au point par Trager et Jensen en 1976<sup>16</sup> pour les formes érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*. Cette méthode de culture permettant de mesurer l'activité d'un médicament schizonticide sur un cycle complet de 48 heures et même sur plusieurs cycles successifs, a été automatisée par Desjardins<sup>17</sup> en utilisant l'incorporation de précurseurs marqués du métabolisme des parasites. Le pourcentage d'incorporation dans les structures des parasites est relié à l'effet d'inhibition des molécules présumées anti-parasitaires et le comptage est effectué automatiquement par des compteurs à scintillation. Cette technique qui supprime l'étape de fixation, de coloration et de comptage visuel des parasites en culture accélère considérablement l'évaluation de l'activité *in vitro* des molécules.

#### 1.1.4.1.1.2. Modèles *in vivo*

La mise en évidence des activités antipaludiques des médicaments est effectuée en provoquant chez différents animaux une maladie expérimentale plus ou moins voisine du paludisme humain. Les modèles expérimentaux de paludisme vont reproduire les accès palustres avec la schizogonie érythrocytaire seulement (transmission par injection de globules rouges parasités) ou le développement complet de l'affection avec la schizogonie tissulaire (transmission par piqûre infestante d'anophèles parasitées ou injection de sporozoïtes). Les modèles utilisés pour les études préliminaires sont des paludismes de rongeurs (*P. berghei berghei*, *P. berghei yoelii*) ou des paludismes aviaires (*P. gallinaceum* sur le poulet, *P. cathemerium* sur le canard). Actuellement, le paludisme expérimental des souris représente le modèle le plus courant car le plus commode.

##### *1.1.4.1.1.2.1. Le paludisme expérimental des rongeurs*

L'espèce la plus utilisée dans les criblages d'agents antipaludiques schizonticides est *P. berghei* isolée en 1948 au Katanga chez un rongeur sauvage, *Thamnomys surdaster*<sup>18</sup>. Elle a été adaptée chez les souris de lignées non consanguines avec une pathologie très proche de

l'homme non immun. La pathologie se caractérise par la mort des souris après un temps dont la durée est fonction de la quantité de parasites injectés au début du test avec colonisation quasi totale des hématies par les protozoaires au stade final de la maladie. Le test le plus couramment utilisé est le test suppressif de quatre jours mis au point par Peters<sup>19</sup>. Ce test est choisi en dose unique pour les criblages d'antimalariques à grande échelle. Deux-cinquante mille composés ont été ainsi testés de 1948 à 1963 ce qui représente environ cinq millions de souris sacrifiées car à l'époque aucun test *in vitro* n'était suffisamment fiable pour remplacer l'usage de ce test sur animaux<sup>20</sup>. Peters<sup>19</sup> a montré sa bonne sensibilité aux principales classes d'antipaludiques. Deux sous-espèces sont utilisées *P. berghei berghei* et *P. berghei yoelii*, la première plus souvent que la seconde. En effet, la pathologie associée chez la souris parasitée par *P. b. berghei* semble plus régulière, la mort des souris se situe à 7 jours  $\pm$  1 jour dans l'essai standardisé et l'écart type sur la moyenne des parasitémies d'un même lot est plus faible.

#### 1.1.4.1.1.2.2. *Le paludisme expérimental des singes*

Davidson et coll.<sup>21</sup> ont étudié la toxicité et l'activité schizonticide sanguine et tissulaire de composés antimalariques potentiels chez le singe rhésus (*Macaca mulata*) infesté par *P. cynolmogi*. En effet, l'infection induite par *P. cynolmogi*, chez le singe rhésus, paraît similaire à l'infection induite par certaines formes de *P. vivax* chez l'homme. Cependant un progrès important fut l'utilisation d'une espèce de singe, *Aotus trivirgatus*, par Schmidt<sup>22</sup>. Ces singes sont réceptifs à *P. vivax* et *P. falciparum* et les caractéristiques de l'infection avec ces espèces plasmodiales chez *Aotus* sont semblables à celles observées chez l'homme. Un autre modèle simien susceptible à *P. vivax* et *P. falciparum* a été proposé par l'équipe de l'Institut Pasteur de Cayenne<sup>23</sup>, le singe écureuil ou *Saimiri sciureus*, qui permet de produire des quantités importantes de *Plasmodium* pour des études de chimiothérapie et d'immunologie. La condition limitante pour obtenir un modèle reproductible étant la splénectomie nécessaire pour diminuer la réponse immunitaire du singe et permettre l'invasion des hématies par les parasites. L'avantage du modèle par rapport à celui des *Aotus*, est la possibilité d'élever aisément les singes écureuils et de respecter ainsi la convention de Washington signée par la plupart des pays occidentaux qui interdit l'utilisation pour la recherche de spécimens sauvages d'espèces protégées. Toutefois ces

modèles simiesques extrêmement coûteux ne sont pas adaptés à la phase primaire de test de molécules antipaludiques.

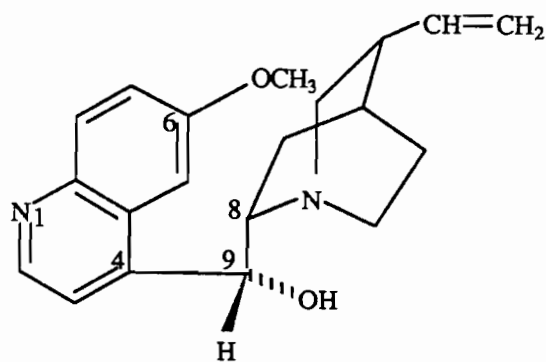
#### 1.1.4.1.2. chimiothérapie antipaludique et principales voies métaboliques

##### 1.1.4.1.2.1. traitements antipaludiques usuels

La chimiothérapie repose essentiellement sur des composés dont les structures ont pour modèle des substances naturelles sélectionnées par les médecines traditionnelles (quinine, artémisinine, fébrifugine). Nous ne développerons que la présentation des grandes classes d'antipaludéens en laissant de côté les classes mineures en sachant que plus de trois cent mille molécules ont été étudiées pour leur propriétés antiplasmodiales par l'Institut Walter Reed de l'armée américaine à l'occasion de la deuxième guerre mondiale et de la guerre du Vietnam<sup>24</sup>. Nos informations sont essentiellement extraites de l'excellent ouvrage traitant de la chimiothérapie du paludisme de Bryskier et Labro<sup>25</sup>.

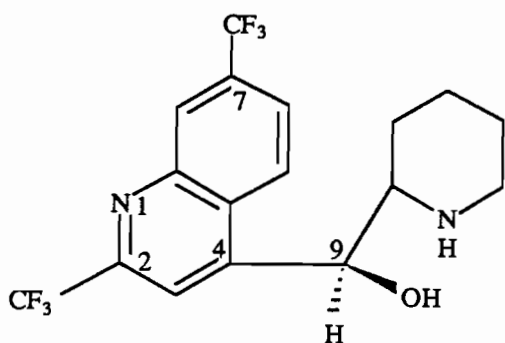
##### 1.1.4.1.2.1.1. Arylméthanol (quinine et dérivés)

Cette classe d'antipaludéens regroupe des molécules naturelles et synthétiques qui ont pour modèle la quinine. L'écorce de quinquina, drogue dont l'origine de l'usage est controversée, aurait été utilisée dans les pharmacopées amérindiennes des régions andines à l'ouest du bassin amazonien. La drogue est utilisée par la médecine occidentale depuis le XVIème siècle pour soigner les fièvres intermittentes des marais avant même l'isolement de la quinine par Pelletier et Caventou en 1820<sup>26</sup> et l'identification du parasite du paludisme par Laveran à Constantine en 1880. Des diverses espèces de *Cinchona* ont été isolés trente-cinq alcaloïdes. La plupart de ceux-ci possèdent un noyau quinoléine et les alcaloïdes efficaces contre le paludisme ont une structure aryl-méthanol avec un noyau quinoléique lié par un pont hydroxyméthylène à un noyau quinuclidine (1).

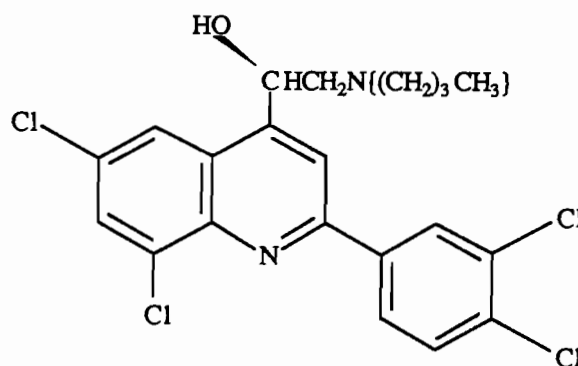


**1** Quinine

Les isomères *érythro* sont plus actifs que les isomères *thréo* dans les alcaloïdes naturels. La présence d'un hydroxyle libre en 9 est essentiel pour l'activité antiplasmodiale. Des substituants variés peuvent être fixés sur les composés de synthèse sur le noyau quinoléique comme des substituants trifluorométhyle en 2 et 7 pour la méfloquine (2) ou un phényle en 2 pour le WR30090 (3). Le principal métabolite de la cinchonine ou de la quinine est un dérivé hydroxylé en 2. Le blocage de cette position par un substituant adéquat évitant l'oxydation de la molécule, et donc son élimination rapide, augmente ainsi l'activité de la molécule. Le noyau quinuclidine peut être modifié ou remplacé par un autre hétérocycle comme une pipéridine dans la méfloquine. L'usage de la méfloquine était recommandé par l'O.M.S. jusqu'à tout récemment en cas de résistances aux autres antipaludiques. Malheureusement, son usage entraîne chez certains sujets des troubles psychiatriques graves<sup>27</sup>.

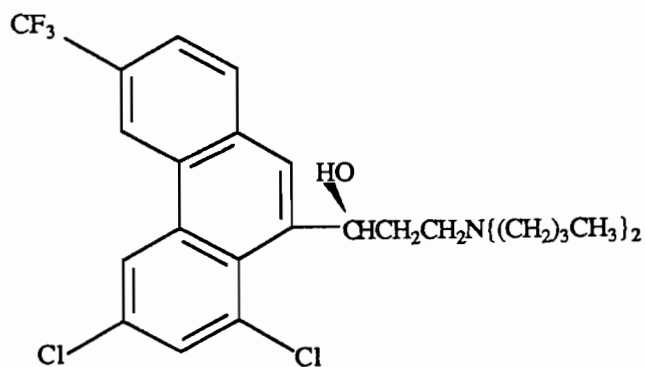


**2** Méfloquine



**3** WR 30090

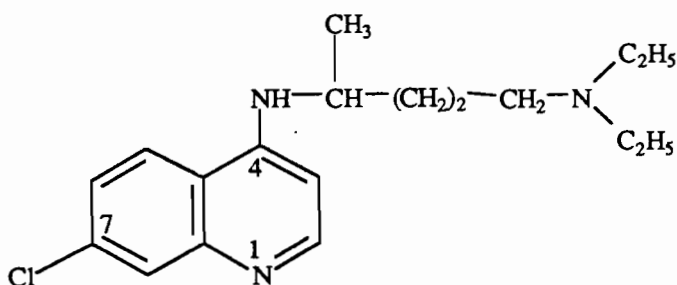
Des dérivés phénanthréniques des aryls-méthanols ont été synthétisés pendant la seconde guerre mondiale et les recherches ont été poursuivies pendant les années soixante-dix pour aboutir à la mise au point de l'halofantrine (4). Elle a montré une efficacité certaine dans des essais cliniques sur des soldats thais en Indochine, sur des malades atteints de paludismes aigus aux îles Salomon, à Karachi au Pakistan, sur des enfants au Gabon, sur des enfants dont les parasites étaient résistants à la chloroquine au Kenya<sup>28</sup>. Elle pourra suppléer à une défaillance prévisible de la méfloquine quoique l'halofantrine appartienne à la même classe structurale que la méfloquine.



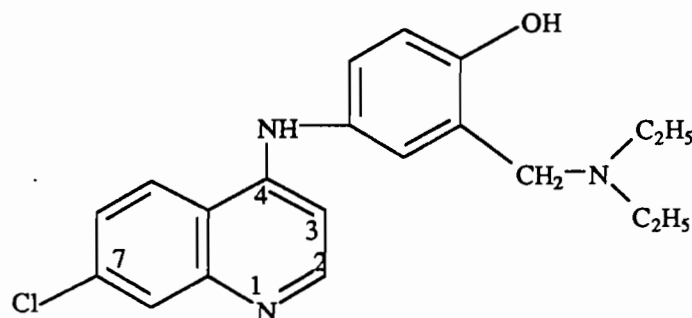
**4** Halofantrine

#### 1.1.4.1.2.1.2. Amino-4-quinoléines

Les dérivés amino-4-quinoléines comprennent essentiellement la chloroquine (5) qui est le chef de file de cette classe thérapeutique et l'amodiaquine (6).



**5** Chloroquine



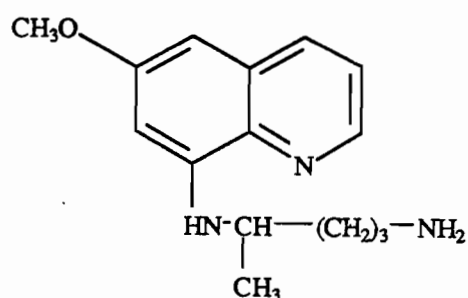
**6** Amodiaquine

La chloroquine synthétisée en 1934, a montré une bonne action schizonticide. Elle est active sur les formes érythrocytaires non sexuées des quatre espèces de *Plasmodium* humains. Le mécanisme d'action de la chloroquine est controversé. Une observation de l'agglomération des pigments malariques sous l'effet de la chloroquine a orienté les recherches vers une inhibition par la chloroquine de la métabolisation de l'hémoglobine de l'érythrocyte parasité par le *Plasmodium*. Il a aussi été noté que la chloroquine s'intercalait dans la structure de l'A.D.N. parasitaire. Mais cette insertion n'a pas d'effet parasiticide et s'observe dans d'autres types de cellules sans provoquer de troubles métaboliques<sup>29</sup>. Un mécanisme hypothétique<sup>30</sup> ferait intervenir une perméase membranaire parasitaire qui contrôlerait la sortie de la chloroquine du

parasite. La résistance des parasites à la chloroquine serait due, comme dans le cas des résistances des cellules tumorales aux antitumoraux, à une augmentation de l'activité de relargage du médicament dans le milieu extérieur. Cette perméase hypothétique serait un site d'action très utile pour sélectionner des drogues adjuvantes à la chloroquine lui permettant de continuer à être aussi efficace sur les parasites résistants que sur les souches sensibles.

#### 1.1.4.1.2.1.3. Amino-8-quinoléines

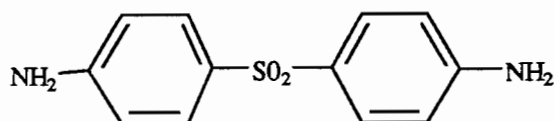
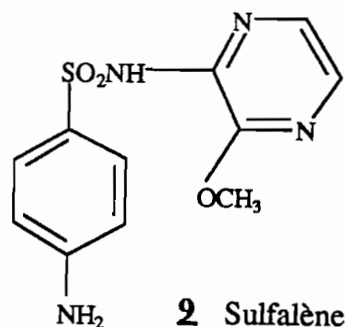
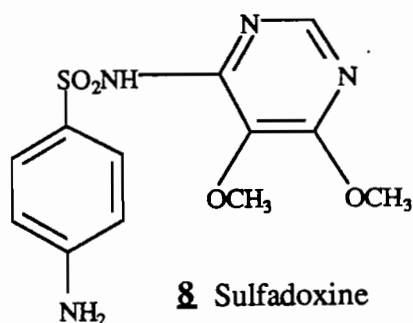
La primaquine (7) est la seule des amino-8-quinoléines qui soit utilisée en thérapeutique humaine. Elle est active sur les formes exoérythrocytaires de *Plasmodium vivax* et *P. ovale* et évite ainsi les rechutes dues aux hypnozoïtes quiescents hépatiques. Son activité est faible sur les formes érythrocytaires ainsi que sur les sporozoïtes infectants<sup>29</sup>.



7 Primaquine

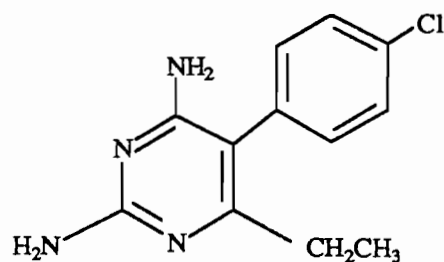
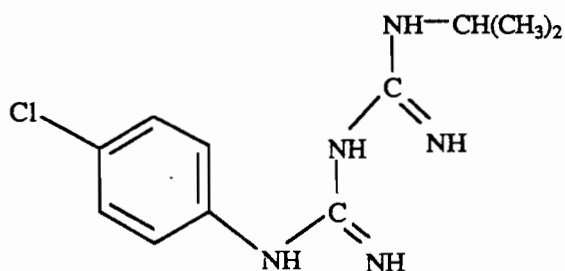
#### 1.1.4.1.2.1.4. Antifolates

Le rôle des sulfamides comme antipaludique a été mis en évidence par Diaz de Leon<sup>31</sup> et rapidement leur rôle dans l'inhibition de l'incorporation métabolique chez les bactéries et chez les parasites a été admis<sup>25</sup>. Le développement des résistances de *P. falciparum* aux amino-4-quinoléines a valu un regain d'intérêt aux antifolates car ils sont actifs sur les souches chloroquino-résistantes. Cette classe de composés regroupant d'une part les sulfamides, sulfadoxine (8) et sulfalène (9) et d'autre part les sulfones, comme la dapsonne (10), présente une action schizonticide plutôt lente qui en a réduit l'intérêt par rapport aux amino-4-quinoléines ou à la quinine.



Ces antifoliques agissent en bloquant l'activité de la dihydroptéroate synthétase qui permet la synthèse de l'acide dihydrofolique à partir de l'acide *para*aminobenzoïque ou PAB indispensable à la survie du parasite.

Ces antifoliques doivent être associés à des antifoliniques pour augmenter leur activité et aussi diminuer le risque de voir apparaître des résistances. Les antifoliniques qui sont les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase regroupent des biguanides [proguanil (**11**)] et des diaminopyrimidines [pyriméthamine (**12**)].



La seule association antifolique-antifolinique commercialisée en France actuellement est l'association sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar<sup>®</sup>) qui ne doit être utilisée en prophylaxie

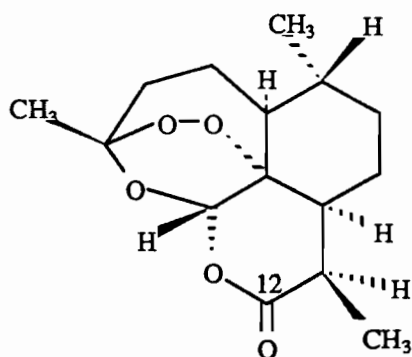
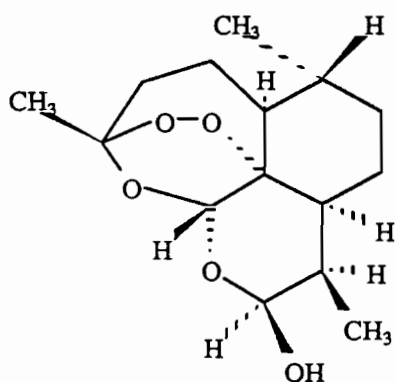
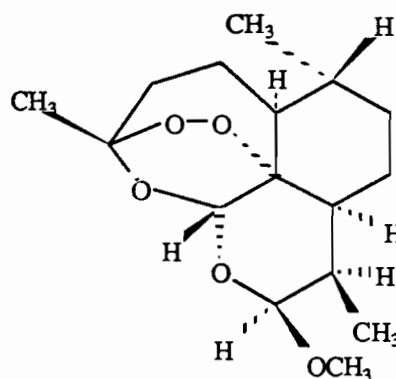
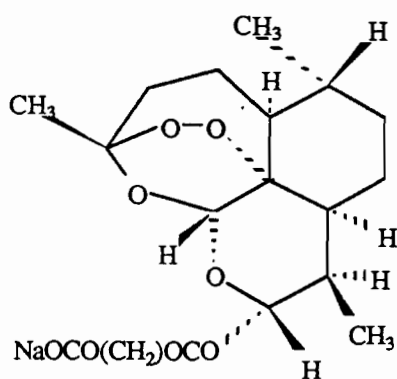
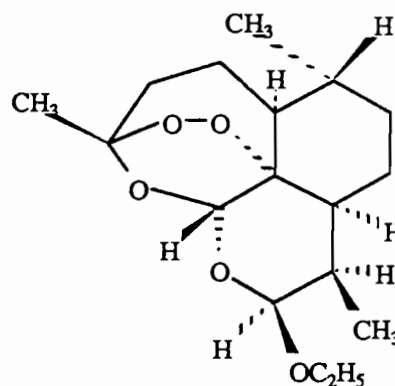
que dans les régions où la résistance aux amino-4-quinoléines est confirmée<sup>32</sup> et avec précaution du fait des effets secondaires éventuels comme le syndrome allergique.

#### 1.1.4.1.2.2. Molécules en développement (études cliniques)

##### *1.1.4.1.2.2.1. Artémisinine (Qinghaosu ou QHS) et dérivés*

L'artémisinine, principe actif antipaludique isolé en 1972 par une équipe chinoise de l'Institut de Pharmacologie de Shanghai s'est montré actif comme schizonticide sur *Plasmodium berghei* infectant la souris<sup>33</sup>. Il s'agit d'un sesquiterpène lactonique (**13**) avec un pont endoperoxyde, structure originale dans la chimie des substances naturelles. Elle a été isolée d'une ASTERACEAE (Compositae) *Artemisia annua* L., herbacée rudérale spontanée utilisée par la pharmacopée traditionnelle chinoise depuis 340 ap. J.C.. Son usage comme antipyrétique en tisane avait été décrit dans une pharmacopée de cette époque<sup>33</sup>. Cette armoise pousse dans beaucoup de régions du monde y compris sur le continent nord-américain. Seule, la variété chinoise contient l'artémisinine et se montre donc antipaludique<sup>25</sup>. Le pont endoperoxyde a été reconnu indispensable à l'activité antipaludique mais n'est pas suffisant pour conférer à la molécule l'effet schizonticide<sup>34,35</sup>. Toutefois des molécules portant le noyau trioxane avec un noyau supplémentaire quelconque ont montré une activité intéressante *in vitro* sur *P. falciparum* suivant une étude de l'Université de Genève<sup>36</sup>. La fonction lactonique n'est pas indispensable dans ce type de molécule. Mais, il reste à confirmer cette activité des trioxanes *in vivo*.

La réduction du carbonyle en 12 du QHS en hydroxyle donne la dihydroartémisinine (**14**) qui elle-même est plus active et permet d'introduire des fonctions solubilisantes dans les solvants protiques. En effet, l'artémisinine est soluble surtout dans les solvants organiques, très peu soluble dans l'eau, mais aussi peu soluble dans l'huile. La méthylation de l'hydroxyle en 12 donne l'artéméther (**15**) qui est soluble dans les huiles et est utilisé en injection intramusculaire en solution huileuse dans les essais cliniques. Le dérivé hydrosoluble (**16**) est obtenu en estérifiant la fonction hydroxyle avec l'acide succinique. Brossi et coll.<sup>37</sup> ont préparé des dérivés  $\alpha$  et  $\beta$  avec les différentes fonctions vues précédemment.

**13** Artémisinine**14** dihydro artémisinine (série  $\beta$ )**15** artéméther (série  $\beta$ )**16** artésunate (série  $\alpha$ )**17** artééther (série  $\beta$ )

Le composé paraissant le plus intéressant dans cette étude est l'artééther (17) avec l'éthylate en position  $\beta$ , possédant une bonne activité sur le paludisme murin à *P. berghei* y compris sur les souches rendues résistantes expérimentalement à toutes les familles d'antipaludiques<sup>37</sup>.

La toxicité aiguë de l'artémisinine a été étudiée chez les rongeurs et cette molécule montre une faible toxicité bien inférieure à celle de la chloroquine avec une activité antipaludique supérieure. Par contre ce composé étudié sur les femelles gravides de rongeurs a été montré fœtotoxique<sup>25</sup>.

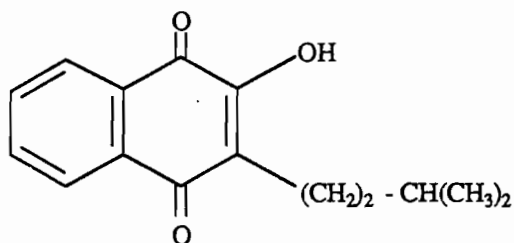
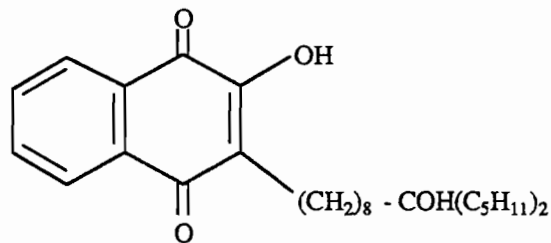
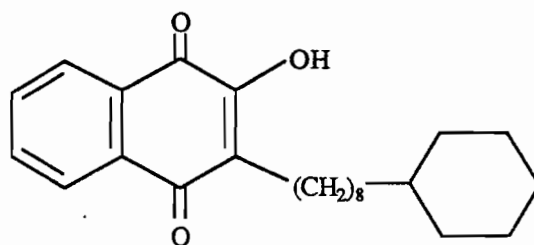
Le mécanisme d'action semble toucher la synthèse protéique des stades jeunes. La molécule interfère aussi avec le coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et donc pourrait jouer un rôle dans l'inhibition des systèmes énergétiques mis en œuvre pour assurer la croissance des stades jeunes.

L'étude clinique, comme c'est souvent le cas des recherches chinoises sur les plantes de la médecine traditionnelle, accompagne voire précède les études pharmacologiques et toxicologiques. Une grande étude prospective a été publiée en 1979 sur plus de deux mille patients atteints de paludisme à *P. vivax* et *P. falciparum* dont cent quarante et un cas de neuropaludisme. L'épuration parasitaire a été obtenue plus rapidement avec le QHS qu'avec la chloroquine. Mais le taux de rechute est important aussi bien avec *P. vivax* (20%) qu'avec *P. falciparum* (5-10%). Toujours dans cette étude, l'activité sur le neuropaludisme est plus intéressante que celle de la quinine et de la chloroquine<sup>25</sup>.

L'utilisation des composés antipaludiques de *Artemisia annua* passe sans doute par la culture de la plante et par l'extraction de son principe actif comme le recommande l'OMS<sup>33</sup> quoique une synthèse totale ait été réalisée<sup>38</sup>.

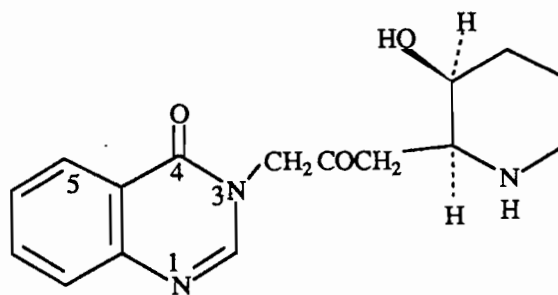
#### 1.1.4.1.2.2.2. *Lapachol et dérivés (HO-naphtoquinones)*

Les hydroxy-2-naphtoquinones comme le lapachol (18) et la lapinone (19) ont été synthétisées il y a une quarantaine d'années pour évaluer leur activité antipaludique<sup>39</sup>. Ces activités n'étaient pas suffisamment intéressantes par rapport aux quinoléines qui ont été développées à la même période mais la résistance des parasites aux antipaludiques a fait redémarrer les recherches sur cette famille de molécules. Ces quinones semblent avoir deux niveaux d'intervention sur le métabolisme des parasites : l'hydrolapachol inhibe la dihydroorotate déshydrogénase qui assure la formation d'orotate, précurseur de la thymidine; la ménocitone (20), nouvelle hydroxy-naphtoquinone développée par le Walter Read Institute bloque la chaîne respiratoire mitochondriale respiratoire entre les cytochrome b et c<sub>1</sub>. La présence d'ubiquinones rend réversible le phénomène<sup>25</sup>. Toutefois, les dérivés quinoniques semblent mal absorbés au niveau du tractus intestinal, ce qui expliquerait leur faible activité par voie orale chez l'homme<sup>25</sup>.

**18** Hydrolapachol**19** Lapinone**20** Ménoctone (WR 49908)

#### 1.1.4.1.2.2.3. la fébrifugine

La fébrifugine a été extraite de *Dichroa febrifuga* SAXIFRAGACEAE, la plante étant utilisée en médecine chinoise comme fébrifuge. Son activité antipaludique a été mise en évidence dès 1946 et sa structure a été élucidée en 1952<sup>25</sup> (21).

**21** Fébrifugine

C'est un schizonticide puissant qui est actif sur tous les modèles expérimentaux de paludisme ; son activité est plusieurs dizaines de fois supérieure à celle de la quinine dans l'infection du

poulet par *P. gallinaceum* infectant le poulet. L'usage thérapeutique chez l'homme infecté par *P. vivax* a été évaluée. L'intolérance digestive observée lors de sa prise par voie orale n'a pas permis de continuer les essais, d'autres essais sur la souris ont montré également une toxicité hépatique<sup>40</sup>. De nombreux dérivés ont été synthétisés permettant d'évaluer le rapport structure-activité mais n'ont pas été développés.

#### 1.1.4.1.3. Résistances à la chimiothérapie antipaludique

Des différences de sensibilité à la quinine ont été observées depuis le début de ce siècle. Il s'agissait plutôt de variations géographiques de la sensibilité des souches plasmodiales que de résistance à la quinine. Mais actuellement, les souches quinino-résistantes sont retrouvées en Asie du Sud-est (Thaïlande, Birmanie, Indonésie, Cambodge), en Amérique latine, en Océanie et en Afrique centrale. Dès 1982, des souches résistantes à la méfloquine (aryl-méthanol proche de la quinine) ont été isolées en Thaïlande. Les antifolates, non homogènes chimiquement se caractérisent par un même mode d'action : inhibition de la synthèse de l'acide folique. Ils donnent lieu à une résistance croisée souvent partielle, du fait de leur site d'action différent dans la chaîne de synthèse de l'acide folique. L'apparition de souches de *P. falciparum* résistantes aux amino-4-quinoléïnes a été reconnue en Amérique latine puis en Asie du Sud-est dans les années soixante. Cette résistance s'est étendue à certaines parties du continent africain et s'est généralisée dans la plupart des endroits touchés<sup>25</sup>. L'effort de recherche de nouvelles molécules antipaludiques est donc d'actualité et la voie des substances naturelles, riche de succès passés peut être de nouveau explorée.

#### 1.1.4.1.4. Recherche d'antipaludiques d'origine naturelle

Le plus grand criblage de plantes présumées antipaludiques remonte à une quarantaine d'années<sup>41</sup>. Un grand nombre d'espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle comme fébrifuges dans le monde entier (plus de six cents plantes, représentant de cent-vingt-six familles) ont été testées. Le choix des plantes a été fait en fonction de la littérature ethnobotanique de l'époque qui péchaient par deux défauts : l'absence de référence de collection d'herbier et des enquêtes prenant en compte non pas un groupe culturel particulier mais le plus

souvent un pays tout entier. Ainsi la multiplicité et la variété des pharmacopées traditionnelles dans chaque pays étaient peu prise en considération. Les tests *in vivo* utilisés ont été *P. cathemerium* et *P. lophurae* infectant les canards et *P. gallinaceum* infectant les poulets. Toutefois, Philipson s'est interrogé sur la prédictivité chez l'homme de ces tests effectués sur des *Plasmodium* d'oiseaux<sup>42</sup>. Une trentaine de plantes ont montré une activité intéressante dans ce criblage; la plupart appartiennent à la famille des SIMAROUBACEAE.

Un autre grand criblage a été effectué plus récemment sur des plantes issues des médecines traditionnelles d'Amazonie. Sur 148 espèces testées sur *P. berghei*, aucune n'a montré d'activité aux doses testées<sup>43</sup>.

A côté de ces inventaires, on peut citer divers travaux plus ponctuels :

Les alcaloïdes quinoléïques de *Ptelea trifoliata*, arbuste nord-américain utilisé comme fébrifuge en Louisiane au 19<sup>ème</sup> siècle<sup>44</sup>, sont inactifs sur *P. yoelii* chez la souris.

Une activité antipaludique est indiquée succinctement pour des extraits hydro-alcoolique de deux plantes pantropicales *Momordica charantia*, CUCURBITACEAE et *Cassia occidentalis*, PAPILIONACEAE sur *P. berghei* par une équipe brésilienne<sup>45</sup> à la dose de 1g.kg<sup>-1</sup>.

Une autre équipe brésilienne<sup>46</sup> a testé l'activité antipaludique de deux espèces du même genre botanique, *Potomorphe peltata* et *P. umbellata*. Seul l'extrait éthanolique des feuilles de la dernière espèce présente une inhibition de 50% de la parasitémie des souris infectées par *P. berghei* à la dose de 500 mg.kg<sup>-1</sup>. Ces deux plantes sont confondues par la population et utilisées indifféremment comme fébrifuges.

En Afrique, un travail d'ethnobotanique assez complet a précédé un triage antipaludique sur la pharmacopée d'une communauté Hausa au Nord du Nigéria<sup>47</sup>. Mais, il manque les références des collections d'herbiers indispensables pour suivre le devenir de l'identification botanique de ces plantes. D'autre part les symptômes sélectionnés par l'auteur se rapportant au traitement traditionnel du paludisme sont multivariants : les fièvres, mais aussi l'hépto-splénomégalie, la jaunisse, l'anémie et l'hématurie. Tous ces symptômes ne sont pas spécifiques du paludisme mais dans une situation de prévalence de cette affection, ils peuvent s'y rapporter. Un intérêt de cette publication est le rapprochement fait entre le métabolisme oxydo-réducteur des *Plasmodium* parasitant les hématies et les potentialités oxydo-réductrices des plantes utilisées

pour traiter le paludisme. Le déficit en Glucose-6-phosphate-déshydrogénase chez certaines populations noires, un régime appauvri en vitamine E ( vitamine anti-oxydante) protégeraient selon Etkin, les populations des atteintes graves du paludisme par un potentiel oxydant élevé dans les hématies, préjudiciable à la survie des parasites. La génération de radicaux oxydants est ainsi supposée être le principal mécanisme d'action d'antiparasitaires agissant sur les parasites intracellulaires. Ce mécanisme d'action a d'ailleurs été évoqué pour expliquer l'action de la vicine présente dans les fèves comme antipaludique<sup>48</sup>. D'ailleurs, les sujets déficients en Glucose-6-phosphate-déshydrogénase sensibles à la vicine sont résistants au paludisme. Pour évaluer l'intérêt des plantes sélectionnées, l'auteur mesure l'activité oxydante d'une douzaine de plantes sur le glutathion et sur l'hémoglobine. Les plantes présentant les plus grandes potentialités oxydantes, sont testées sur le paludisme expérimental de la souris à *Plasmodium berghei*. Une bonne corrélation apparaît entre les tests d'évaluation du potentiel oxydant des extraits des plantes et leur activité sur *P. berghei* chez la souris. Trois espèces ont une activité intéressante *in vivo*, il s'agit de *Acacia arabica*, *Azadirachta indica* et *Guiera senegalensis*. Toutefois, la partie expérimentale de cette publication est inexistante.

Quelques plantes médicinales africaines ont été essayées pour leur activité antipaludique en utilisant le test dit de Rane qui mesure le temps de survie de souris infectées par *P. berghei*, traitées par les plantes par rapport à des souris témoins infectées dans les mêmes conditions. Dans ce triage, quelques RUTACEAE ont été testées. Aucune plante n'a montré d'activité, certaines sont toxiques aux doses testées<sup>49</sup>.

L'extrait alcoolique d'une RUBIACEAE africaine *Morinda lucida* a été testé par Obih et coll.<sup>50,51</sup> en utilisant le test suppressif sur *P. berghei* infectant la souris. Cette plante est utilisée suivant les auteurs dans une grande partie du Nigéria contre les fièvres. Les différents extraits testés ont montré une certaine activité aussi bien par voie orale qu'en injection sous-cutanée. Mais le principe actif n'a pas été isolé et les extraits montrent une toxicité à des doses à peine supérieures aux doses actives sur les protozoaires. Il faut noter que précédemment, il a été montré une activité antitumorale *in vivo* sur la souris<sup>52</sup> (ralentissement de la formation d'une ascite due au sarcome 180) de 50 mg.kg<sup>-1</sup> d'une substance cristallisée non identifiée, extraite de cette plante. Toutefois des doses supérieures ont montré une forte toxicité sur la souris et le

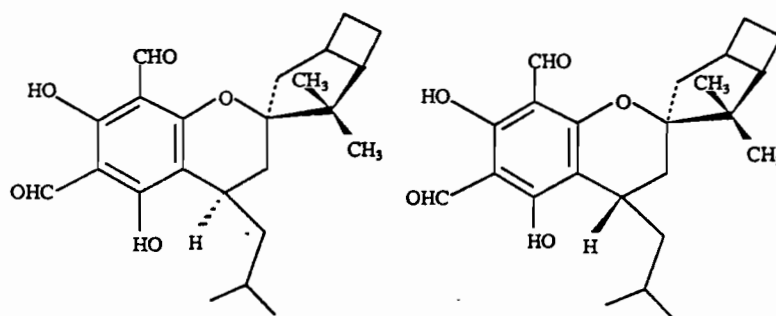
composé isolé n'a pas d'activité suivant l'auteur sur les leucémies de la souris à cellules L1210 et P388.

Un travail de screening *in vivo* sur *P. berghei* a été effectué par une équipe du Rwanda<sup>53</sup> sur dix-huit plantes réputées antimalariques dans le pays, mais l'origine ethnique des informations ethnobotaniques recueillies ne figure pas dans l'article ni les références des collections d'herbiers. Les extraits méthanoliques ont été testés à la concentration de  $1\text{g.kg}^{-1}$  dans le cadre du test suppressif sur la souris. Les résultats sont indiqués en pourcentage d'inhibition des parasitémies des groupes traités par rapport à la parasitémie du groupe témoin.

Un autre travail africain repose sur un test *in vitro* utilisant des parasites de l'espèce *P. falciparum* recueillis directement à partir de sang de paludéens, ici des enfants<sup>54</sup> n'ayant pas subi de traitement préalable à la chloroquine. Les quatre plantes testées dont les trois premières sont des plantes fébrifuges africaines classiques : *Morinda lucida*, *Azadirachta indica*, *Cassia occidentalis* et *Securinega virosa*, ont montré une toxicité sur *P. falciparum*. Ce travail présentait un défaut, car le mode de préparation ne permettait pas de connaître la quantité d'extrait mis effectivement en présence des parasites. Il a été remanié récemment avec l'ajout de nouvelles plantes et des modifications de méthodologie permettant de mieux évaluer l'importance des activités décrites<sup>55</sup>.

Une équipe du Nigéria<sup>56</sup> a mesuré l'activité antipaludique d'une BIGNONIACEAE *Spathodea campanulata* sur *P. berghei* infectant la souris en utilisant le test suppressif de quatre jours et le test de survie dit test de Rane. Les extraits chloroformique et hexanique des écorces de tige de la plante sont actifs avec un taux d'inhibition de presque 80% à la dose de  $400\text{mg.kg}^{-1}$ .

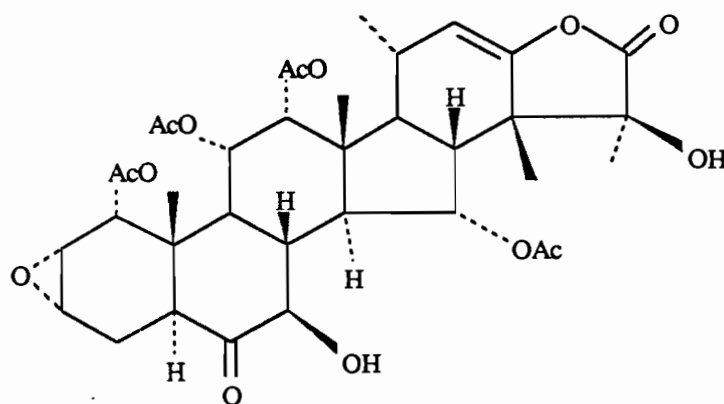
En Asie, dans la pharmacopée chinoise antipaludique, en plus de l'artémisinine et de la fébrifugine, ont été isolés d'un eucalyptus réputé antimalarique (*Eucalyptus robusta*) deux composés terpénoïques, les robustadial A (22) et B (23) possédant une partie spirannique originale. Ils ont été reportés comme actifs par les auteurs sur *P. berghei* chez la souris<sup>57,58</sup>.



**22** Robustadial A

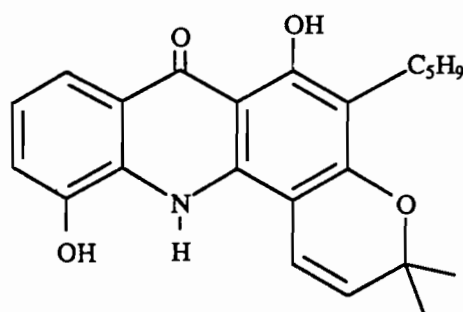
**23** Robustadial B

Un autre composé actif le taccanolide A (24) a été isolé d'une plante médicinale chinoise *Tacca plantaginea*. Il serait actif sur *P. berghei* infectant la souris, mais la publication<sup>59</sup> rapportant ce travail ne donne aucune précision sur les modalités de mise en évidence de l'activité de ce stéroïde amer.



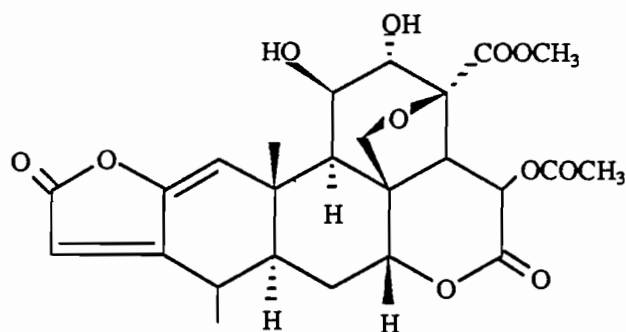
**24** Taccanolide A

A Tai Wan, certains dérivés d'un alcaloïde antitumoral, l'acronycine, isolés de trois espèces de Rutacées<sup>60</sup> ont montré récemment une très intéressante activité sur *P. yoelii* à la concentration de  $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  *in vitro*<sup>61</sup>. Sur trente alcaloïdes testés, treize ont une inhibition supérieure à 70 %. L'activité *in vitro* a été confirmée *in vivo* pour l'un d'entre eux, l'atalaphilline (25) sur le paludisme murin à *P. berghei* à la dose de  $50 \text{mg}.\text{kg}^{-1}$  pendant trois jours ; une dose unique de  $150 \text{mg}.\text{kg}^{-1}$  n'a pas donné de signe de toxicité sur les souris dans un test de toxicité aiguë.



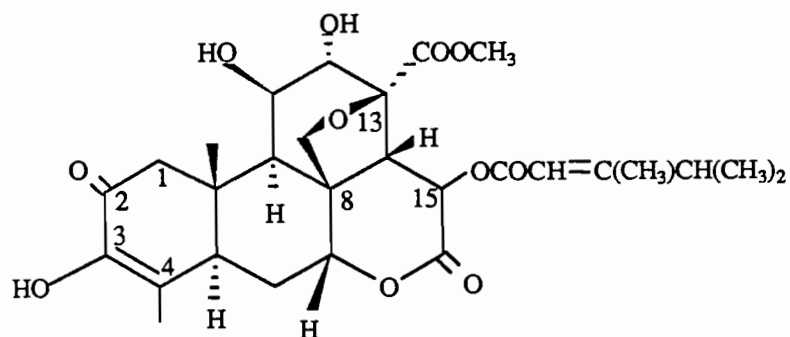
**25** Atalaphilline

De nombreuses SIMAROUBACEAE sont utilisées dans les pharmacopées traditionnelles comme fébrifuges sans doute à cause de leur goût extrêmement amer. Dès 1947, le criblage de Spencer<sup>41</sup> a montré une activité intéressante de la plupart de ces SIMAROUBACEAE sur le paludisme des oiseaux. Trager et Polonsky (1981)<sup>62</sup> ont mis en évidence la forte activité antipaludique *in vitro* des quassinoides extraits de SIMAROUBACEAE. Poursuivant les travaux de Trager et Polonsky, l'ORSTOM et l'Institut Pasteur de Cayenne ont montré que le sergéolide (26), quassinoides extrait d'une SIMAROUBACEAE guyanaise réputée antipaludique présentait une forte activité antipaludique *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* et *in vivo* sur le paludisme expérimental du rongeur infesté par *Plasmodium berghei*<sup>63</sup>.

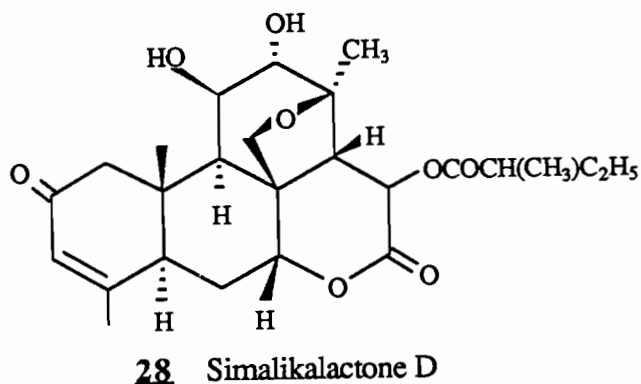


**26** Sergéolide

L'étude des quassinoides antipaludiques a été reprise et étendue à l'ensemble des composés de cette famille par l'équipe de Phillipson<sup>64,65,66,67,68,69</sup>. Elle montre que les quassinoides les plus actifs comme le sergéolide, la brucéantine (27), la simalikalactone D (28) sont actifs *in vitro* à des doses de l'ordre du nanogramme par ml de milieu. Toutefois l'activité *in vivo* est entachée d'une très forte toxicité sur la souris pour l'ensemble des composés testés de cette famille. L'activité de ces quassinoides semble liée comme pour l'artémisinine à la présence d'un pont endoperoxyde, ici sur le noyau C.



**27** Brucéantine



Cette revue indique que le nombre des programmes de recherches de composés naturels antipaludiques a beaucoup augmenté ces dernières années essentiellement dans le domaine de la vérification de l'activité de plantes utilisées en médecine traditionnelle. Des résultats intéressants sont déjà obtenus et notre recherche s'intègre dans cet effort international.

#### 1.1.4.2. Vaccination et lutte antivectorielle

La recherche d'un vaccin antipaludique actif sur un ou plusieurs stades du développement du parasite, mobilise la plus grande part des forces de recherche mondiale dans ce domaine. Mais, la variabilité antigénique du genre *Plasmodium* rend difficile une immunisation durable<sup>70</sup> et le coût inflationniste des recherches sur le vaccin risque de rendre son prix de vente prohibitif pour les populations pauvres du tiers-monde.

La lutte insecticide connaît les mêmes problèmes de résistance que la lutte médicamenteuse, car les insectes vecteurs deviennent résistants aux principaux insecticides, organo-phosphorés ou dérivés de la pyréthrine. De plus la modification des milieux biologiques et les pollutions dues à l'usage massif de ces insecticides nécessitent l'approfondissement d'autres voies de recherches, comme la lutte biologique contre les vecteurs.

Il faut en fait agir en terme de lutte intégrée qui doit intervenir sur tous les aspects du cycle du parasite. Nous tombons d'accord avec Maziers<sup>71</sup> pour dire que "... la perspective d'un vaccin opérationnel, vraisemblablement cocktail de plusieurs molécules, ne doit (pas) freiner les efforts de lutttes anti-vectorielles et chimiothérapeutiques... l'histoire de la lutte antipaludique montre clairement que si l'obtention d'une arme efficace est longue et difficile, plus délicat encore est l'art d'en préserver l'efficacité."

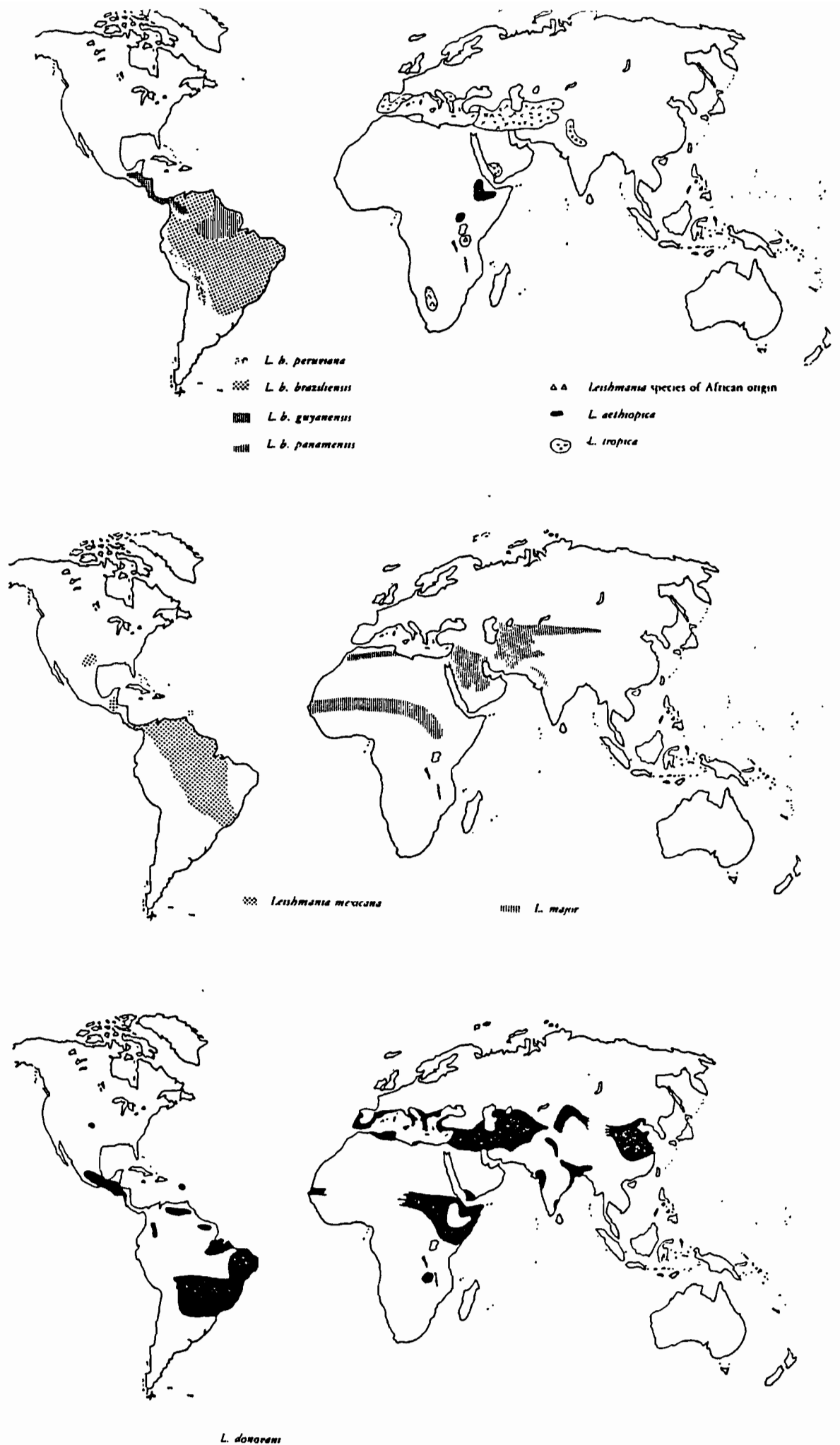


Figure N°2 : Cartes de répartition des espèces de *Leishmania* responsables des pathologies humaines d'après Molyneux : "*Trypanosoma and Leishmania*", p 202-214, Ed. Academic Press.

## 1.2. LEISHMANIOSES

### 1.2.1. Principaux syndromes ; répartitions géographiques.

Il existe deux formes du parasite :

\* la forme promastigote, flagellée, présente chez le vecteur, le phébotome, un petit diptère piqueur très répandu dans les zones tropicales et subtropicales.

\* La forme amastigote, non flagellée, présente dans les macrophages des mammifères hôtes du parasite et responsable des manifestations pathogènes.

La variabilité de l'expression de la pathogénicité des leishmanioses est liée au tropisme particulier des amastigotes des différentes espèces de *Leishmania* pour les macrophages des tissus cutané-muqueux ou viscéraux. La description des différentes nosologies de la maladie est reprise de Marr<sup>72</sup> et la répartition des différentes espèces de *Leishmania* est inscrite sur les trois cartes de la figure N°2 .

#### 1.2.1.1. Leishmanioses cutanées et cutanées diffuses

Les leishmanioses cutanées simples de l'ancien monde sont concentrées dans les zones semi-désertiques de l'Asie centrale et du Moyen-Orient, de l'Afrique du nord et dans les zones sub-sahéliennes de l'Afrique de l'ouest où les rongeurs sont les principaux réservoirs et les parasites le complexe *Leishmania tropica*. Dans le nouveau monde, les leishmanioses sont dues le plus généralement au complexe *Leishmania mexicana* et au complexe *Leishmania braziliensis*. La mise en évidence des parasites doit se faire peu de temps après le début de l'infestation lorsque la lésion est peu ulcérée. En effet la réponse immunitaire cellulaire augmente avec l'accroissement de l'ulcération et la densité des parasites diminue. Les lésions après plusieurs mois d'état stationnaire guérissent le plus souvent spontanément. Les personnes immuno-déprimées voient leur mal évoluer en une leishmaniose cutanée disséminée qui se caractérise par l'apparition de nodules leishmaniens sur tout le corps. Le complexe *Leishmania mexicana* est le plus souvent impliqué dans ces formes disséminées.

#### 1.2.1.2. Leishmanioses cutané-muqueuses

L'espundia ou leishmaniose cutané-muqueuse se rencontre en Amérique du sud et en Amérique centrale. Le complexe *Leishmania braziliensis* est l'agent responsable de cette forme de leishmaniose. Le foyer principal se situe au centre du bassin amazonien et sur la partie est des Andes en moyenne altitude. Elle est plus rare en Amérique centrale mais a été décrite. La forme la plus commune est l'ulcération du palais et de la muqueuse nasale avec une destruction progressive du cartilage qui soutient les muqueuse du visage. Cette localisation particulière est difficile à expliquer, des hypothèses ont été proposées mettant en cause la température inférieure de ces zones par rapport à l'intérieur du corps humain ou les faibles défenses immunitaires à médiation cellulaire du cartilage. La lésion débute après inoculation par le phlébotome sous la forme d'une ulcération cutanée classique évoluant dans 30% des cas vers une leishmaniose muqueuse en quelques mois voire quelques années après la première infestation. Il n'y a pas de guérison spontanée des lésions des muqueuses. Le diagnostic étiologique direct par mise en évidence des parasites à partir de frottis est difficile. Le plus souvent, seule, l'isolement de la souche par injection d'une suspension du grattage de lésion à un hamster donne une réponse. Les techniques d'immunofluorescence indirecte et d'intra-dermo réactions sont des aides précieuses au diagnostic.

#### 1.2.1.3. Leishmanioses viscérales ou Kala-Azar

La leishmaniose viscérale est associée au complexe *Leishmania donovani*. Sa répartition comprend le bassin méditerranéen, le sud de l'U.R.S.S., la Turquie, l'Ethiopie et la Chine. Elle existe dans huit pays d'Amérique du sud, trois d'Amérique centrale et au Mexique. Ce sont des endémies parasitaires majeures en Inde et au Kenya. La maladie dans sa forme avancée est marquée par une hépato-splénomégalie et par une anémie. L'infiltration du Système Réticulo-Histiocytaire (S.R.H.) du foie par les parasites provoque une hypertension portale et une ascite. On met en évidence les parasites dans des ponctions de moelle osseuse. Ces parasites peuvent être mis en culture *in vitro*. La complication majeure est une septicémie mortelle due à une

surinfection bactérienne par baisse des défenses cellulaires de l'organisme.

### 1.2.2. Ecologie de la leishmaniose en Guyane

Le département français de la Guyane se situe en zone équatoriale humide à 5 ° de latitude Nord sur le sous-continent sud-américain. La Guyane se situe dans une région de plateaux comprise entre les bassins de l'Amazone et de l'Orénoque. Cette situation particulière donne une spécificité particulière à la flore et à la faune par rapport aux bassins qui l'entourent. La forêt dense ombrophile *semper virens* forme plus de 90% de son territoire grand comme un cinquième de la France. Elle n'est peuplée que d'environ 100 000 habitants. Le climat guyanais se caractérise par une pluviométrie abondante (environ 4 000 mm d'eau par an) et par une humidité de l'air (près de 100% d'humidité relative en forêt) en rapport avec deux saisons marquées, une grande saison des pluies de novembre à juin et une petite saison sèche de juillet à octobre. Ce biotope est idéal pour le développement des vecteurs et des hôtes des maladies parasitaires en particulier de ceux de la leishmaniose. La leishmaniose en Guyane est due essentiellement à *Leishmania brasiliensis guyanensis*<sup>73</sup> et exceptionnellement à *Leishmania mexicana amazonensis*. Le principal vecteur sylvatique responsable est un phlébotome, *Lutzomia umbratilis*, petit diptère piqueur de la canopée. Le réservoir de *L. brasiliensis guyanensis* est essentiellement le paresseux à deux doigts (*Choloepus didactylus*). L'homme est contaminé en circulant en sous-bois surtout à la fin de la journée et au début de la saison des pluies. Cette zoonose a vu sa prévalence augmentée à partir de 1977 avec le plan vert, lancé par le gouvernement français de l'époque, qui a entraîné la colonisation agricole de pans importants de forêt vierge avec des défrichements pour permettre l'installation de villages forestiers. La situation est très nette au village de Cacao créé en 1977 et habité par des réfugiés du Laos, les Hmongs. Ceux-ci ont subi l'attaque permanente des phlébotomes vivant dans les lambeaux de forêt subsistants en bordure du village, lui-même enclavé dans une région forestière. Depuis l'abattage contrôlé et expérimental de ces résidus forestiers, une baisse très importante de la prévalence de la maladie a été enregistrée dans ce village<sup>74</sup>. Cette étude montre nettement que les risques de contamination augmentent de façon significative chez l'homme si celui-ci se met

en contact prolongé avec la forêt. D'autre part, il a été montré que la dégradation de la forêt primaire est un facteur favorable de la multiplication de *Lutzomia umbratilis* et donc de l'augmentation du risque de contamination<sup>75</sup>. Les grands programmes de colonisation en cours dans les forêts d'Amérique tropicale devraient donc tenir compte du risque important d'augmentation des cas de leishmanioses.

### **1.2.3. La chimiothérapie antileishmanienne**

#### **1.2.3.1. Les modèles d'évaluation de l'activité antileishmanienne**

##### **1.2.3.1.1. Modèles *in vitro***

Un modèle *in vitro* idéal doit être techniquement simple et à la fois pharmacologiquement et immunologiquement comparable à une situation clinique : le modèle idéal pour la pharmacologie est celui dans lequel les parasites sont sensibles aux concentrations sériques maximales atteignables par les composés de référence que sont les sels d'antimoine, la pentamidine ou l'amphotéricine B dans la clinique humaine. Un modèle immunologiquement approprié est dépendant du type viscéral ou cutané de la leishmaniose. Notre étude des modèles et des voies métaboliques explorés reprend celle de Berman<sup>76</sup> complétée par les découvertes récentes sur l'exploration du métabolisme des *Leishmania*.

##### **1.2.3.1.1.1. Promastigotes**

Le modèle le plus simple à utiliser est celui dans lequel les promastigotes se multiplient dans un milieu sans cellules<sup>77</sup>. Le principal avantage de ce modèle est donc sa simplicité ainsi que la facilité avec laquelle les promastigotes peuvent être maintenus congelés, envoyés dans le monde entier pour être ensuite recultivés. Néanmoins, la forme promastigote n'existe que chez le vecteur de la maladie. Leur susceptibilité aux drogues est différente de celle des amastigotes. Les promastigotes de souches cutanées et viscérales sont relativement insensibles aux sels d'antimoine et à la pentamidine. Dans tous les cas, les résultats obtenus doivent être vérifiés dans un modèle employant les amastigotes .

#### 1.2.3.1.1.2. Amastigotes dans les macrophages péritonéaux de souris

Il a l'avantage de présenter une bonne sensibilité aux antileishmaniens usuels<sup>78</sup>. Les cellules péritonéales exsudatives de souris sont simples à obtenir en petite quantité mais les propriétés des macrophages péritonéaux peuvent ne pas correspondre aux propriétés des macrophages du S.R.H. et cutanés humains infectés en clinique.

#### 1.2.3.1.1.3. Amastigotes dans les macrophages tumoraux

Différents modèles ont été utilisés : des cellules sarcomateuses de chien<sup>79</sup> et des macrophages tumoraux de souris<sup>80</sup>. Les macrophages tumoraux ainsi que les amastigotes se multiplient en culture tous les trois jours. La limite des modèles tumoraux est que l'environnement biochimique de la cellule hôte qui se multiplie peut différer de l'environnement que les amastigotes rencontrent à l'intérieur des macrophages dans les infections humaines : on présume en effet que ces macrophages ne sont pas en division. Pour cette raison, les drogues pourraient ne pas agir *in vitro* de la même façon qu'*in vivo*. Ainsi les amastigotes à l'intérieur de cellules sarcomateuses de chien sont insensibles aux sels d'antimoine et à la pentamidine.

#### 1.2.3.1.1.4. Amastigotes dans des macrophages humains issus de monocytes

Les macrophages humains contenant des amastigotes ont été employés comme cellules hôte pour la multiplication des amastigotes car on présume que l'environnement à l'intérieur des macrophages humains *in vitro* mime l'environnement des amastigotes *in vivo*. C'est par adhésion différentielle des monocytes qu'on les sépare du reste des éléments du sang et qu'on obtient les macrophages. Il est important de permettre aux monocytes d'adhérer pendant quelques jours pour obtenir non seulement leur grande taille et adhésivité mais aussi pour permettre aux cellules de se débarrasser de leurs métabolites oxygénés potentiellement leishmanicides<sup>76</sup>. Les amastigotes dans ce modèle sont sensibles aux concentrations sériques maximales atteintes par les composés usuels. La multiplication des leishmanies à l'intérieur des macrophages ainsi que leur sensibilité aux agents usuels aux doses employées en clinique représentent les deux avantages majeurs de ce modèle. Mais ce modèle soulève le problème de la manipulation de grandes quantités de sang complet ainsi que de son obtention. Un petit

nombre de macrophages est obtenu qui ne se multiplient pas. La nécessité d'une maturation enzymatique des macrophages récoltés allonge les temps d'expérimentation.

#### 1.2.3.1.1.5. Conclusion sur l'intérêt respectif de ces modèles

Le modèle de macrophage dérivé de monocyte humain est théoriquement le plus approprié car il ressemblerait le plus au macrophage infecté des situations pathologiques. Toutefois, les capacités immunologiques des seuls macrophages péritonéaux de souris peuvent être facilement altérées, l'interaction entre la chimiothérapie et les réactions immunitaires est ainsi facilement explorée. Un modèle récent qui semble intéressant n'a pas été classé dans les catégories précédentes car il fait appel à une lignée de monocytes humains tumoraux (U 937) qui sont transformés en macrophages adhérents par l'action d'une substance le phorbol, un agent classiquement mitogène<sup>81</sup>. Toutefois, les esters du phorbol ont été signalés récemment comme provoquant à faible dose des altérations des ultrastructures cellulaires des amastigotes et promastigotes de *L. mexicana amazonensis* <sup>82</sup>.

Un inconvénient pour les modèles existants est que le métabolisme des molécules par l'hôte est soit inexistant (promastigotes), soit peu approfondi (amastigotes). Il est par conséquent difficile de prévoir si la nature et la concentration des principes actifs et de leur métabolites sont similaires à celles rencontrées par les organismes au niveau des lésions humaines.

#### **1.2.3.1.2. Modèles *in vivo***

##### 1.2.3.1.2.1. La souris

Le modèle est utilisé pour les infections viscérales et cutanées. Seules les lignées consanguines sont sensibles à l'infection. Les dosages efficaces des antileishmaniens se comparent bien aux dosages généralement utilisés pour traiter les hommes. Mais la pentamidine et l'amphotéricine B ne sont pas efficaces contre la maladie viscérale dans ce modèle<sup>83</sup> (différent de la pathogénie humaine). La maladie cutanée chez des souris consanguines est traitée soit le jour J0 de l'infection soit après plusieurs semaines<sup>84</sup>. On suit l'effet des composés par la différence de taille des lésions entre animaux expérimentaux et les témoins non traités. Les sels d'antimoine n'agissent qu'imparfaitement sur les lésions cutanées. Ils agissent d'autant moins qu'ils sont administrés plus tardivement après la primo-infection. En fonction

des lignées de souris, on obtient des réponses différentes aux leishmanicides classiques. On cherche la lignée dont les réponses à la leishmaniose et à ses traitements serait la plus proche des réponses chez l'homme.

#### 1.2.3.1.2.2. Le hamster

Il s'agit du premier modèle d'étude de l'efficacité des drogues contre la maladie viscérale. Les doses de sels d'antimoine efficaces dans ce modèle sont comparables à celles utilisées en pathologie humaine. Par contre la pentamidine, sept fois plus efficace que les sels d'antimoine chez l'homme, l'est cinq fois moins chez le hamster. L'amphotéricine B par contre est plus active chez le hamster avec toutefois une injection intracardiaque peu usitée chez l'homme. Il a été également essayé comme modèle des formes cutanées. Mais ce modèle est peu sensible aux antileishmaniens usuels<sup>85</sup>.

#### 1.2.3.1.2.3. Le chien

Le chien est l'un des principaux réservoirs de la leishmaniose viscérale. Mais il est moins sensible que l'homme aux antileishmaniens classiques<sup>86</sup>.

#### 1.2.3.1.2.4. Le singe

Le *Saimiri*<sup>87</sup> et l'*Aotus*<sup>88,89</sup> sont sensibles à la maladie viscérale. Les sels d'antimoine sont efficaces dans ces modèles même si la leishmaniose viscérale est ancienne. Mais ces modèles sont coûteux et seront réservés aux études de confirmation d'activité et pharmacocinétique.

#### 1.2.3.1.2.5. Intérêt respectif de ces modèles

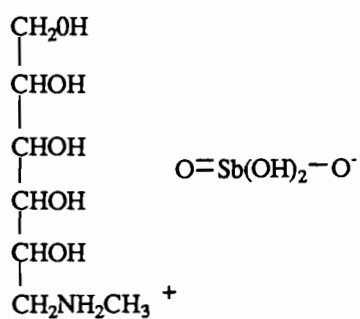
Les modèles *in vivo* sont potentiellement comparables à une situation clinique. Dans les modèles cutanés, les composés classiques sont partiellement efficaces sur la réduction en taille des lésions. Des tentatives pour améliorer l'activité des drogues en déterminant le nombre de parasites après traitement ou en choisissant une race de souris aux paramètres immunologiques proches de ceux des hommes n'ont pas été entreprises systématiquement. Dans les modèles

viscéraux, le traitement des animaux peu après l'infection provoque une guérison avec les sels d'antimoine qui est reproductible et comparable aux doses nécessaires à un traitement efficace chez l'homme. Mais le manque de données immunologiques pour ces modèles constitue un inconvénient. Les malades atteints de leishmaniose viscérale ne guérissent pas spontanément alors que pour les formes cutanées, les guérisons spontanées sont fréquentes. Un modèle *in vivo* idéal serait celui dans lequel les parasites interagissent avec le système immunitaire de l'hôte et avec les agents chimiothérapeutiques d'une façon comparable à ce qui se passe en clinique. Un modèle immunologiquement adapté à la leishmaniose viscérale serait celui dans lequel l'immunité cellulaire contre les antigènes leishmaniens serait inefficace; pour la leishmaniose cutanée ce serait un modèle dans lequel l'immunité cellulaire est présente. Ce modèle aurait une métabolisation et élimination des principes actifs comparable à l'homme. On attend plusieurs semaines avant d'administrer un agent antileishmanien. On évalue soit le nombre de parasites dans la lésion, soit la taille de la lésion elle-même en comparant les animaux traités aux témoins. Selon que la drogue est administrée peu de temps après l'infection ou plus tard, l'expérience évaluera l'effet de la drogue sur la lésion soit seul, soit majoré des éventuels mécanismes immunologiques déclenchés chez l'animal sur une lésion plus infectée. Chez l'homme, on ne traite que lorsque les symptômes sont évidents : une lésion viscérale d'une semaine ou cutanée de trois semaines chez l'animal est comparable à la situation clinique.

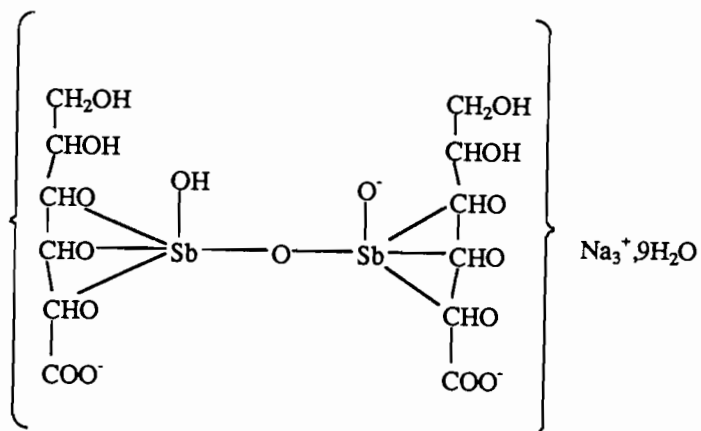
#### 1.2.3.2. Les traitements classiques

Pour traiter les leishmanioses, la pharmacopée est réduite. Il s'agit de médicaments anciens introduits dans le traitement des leishmanioses dans les années 40 : sels d'antimoine pentavalent (29), (30), ou de pentamidine (31), tous plus ou moins toxiques (toxicité rénale, cardiaque et névritique du sel pentavalent d'antimoine; choc et induction de diabète de la pentamidine) et parfois inefficaces (résistance de bon nombre de leishmanioses viscérales à l'antimoniote de N-méthyl-glucamine en Inde et Afrique de l'Est ; résistance des leishmanioses cutanéomuqueuses à *Leishmania braziliensis braziliensis* ). De nouvelles molécules se sont ajoutées depuis comme l' amphotéricine B (32), que malheureusement sa forte toxicité réserve aux traitements hospitaliers, ou le kétoconazole (33) qui n'est pas efficace dans toutes les

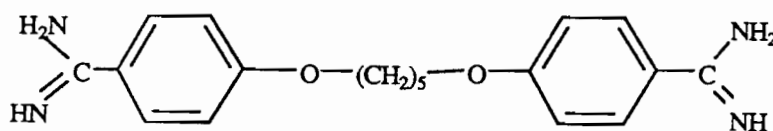
situations cliniques.



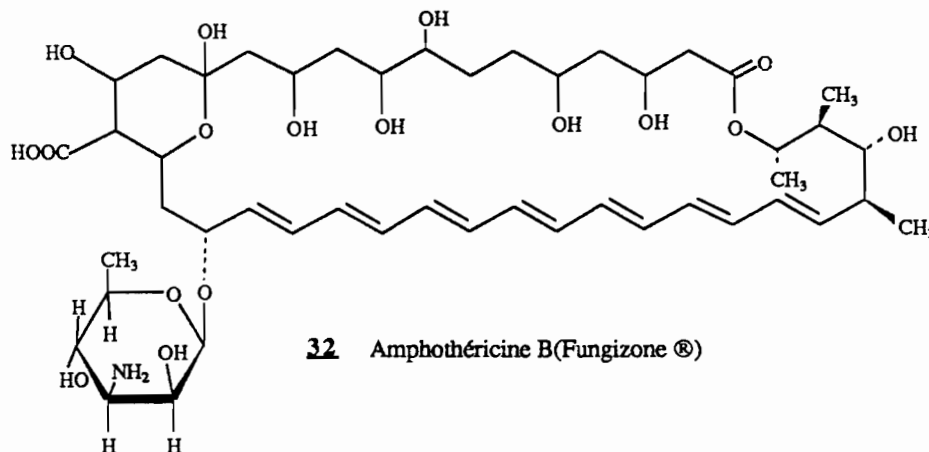
**29** Antimoniate de méglumine (Glucantime ®)



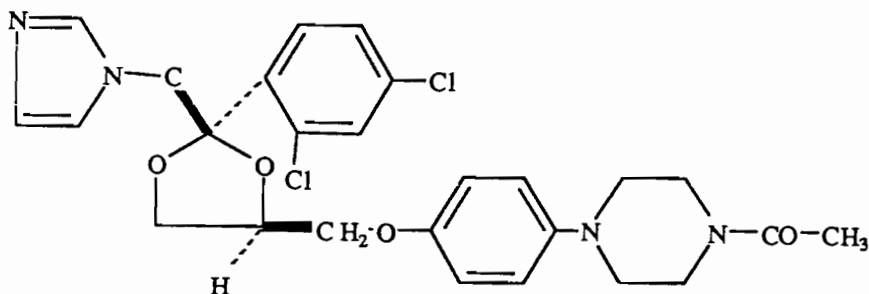
**30** Stibogluconate de sodium (Pentostam ®)



**31** Pentamidine



**32** Amphotéricine B(Fungizone ®)



**33** Kétoconazole

L'apparition de résistances et de souches plus virulentes rend urgente la recherche de nouvelles molécules. L'intérêt scientifique de l'étude du traitement de cette maladie réside dans son étiologie et sa cible parasitaire, le S.R.H. Les parasites sont dissimulés dans les macrophages et l'action des molécules est liée à leur capacité d'atteindre leur cible dans les cellules responsables de la défense immunitaire à médiation cellulaire. Cette situation est comparable dans son principe à celle de la chimiothérapie des syndromes d'immunodéficience acquise (S.I.D.A.) où les composés actifs doivent atteindre le virus dans les lymphocytes et dans les macrophages de nombreux organes.

### 1.2.3.3. Chimiothérapie expérimentale

Un composé antileishmanien idéal devrait être : administrable par voie orale, efficace et non toxique. Les deux dernières propriétés dépendent de l'action d'une drogue sur une enzyme spécifique du parasite et sa relative inactivité chez l'homme. Une approche dans le développement de nouveaux médicaments est de découvrir des composés avec des mécanismes d'action de drogues connues mais sans leurs inconvénients. Le mécanisme d'action des sels d'antimoine est mal connu et non exploité. La pharmacocinétique des sels d'antimoine qui est explorée chez l'homme et le hamster montre une distribution tissulaire similaire<sup>90</sup>. Une action inhibitrice de l'antimoine a été montrée sur la formation de l'ATP, sur l'oxydation glycolytique et celle des acides gras<sup>91</sup>. Mais ces mécanismes sont trop généraux pour envisager la préparation rationnelle d'analogues fonctionnels de ces molécules. Par contre, l'amphotéricine B interagit spécifiquement avec l'ergostérol au sein des membranes fongiques. Or, les stérols leishmaniens sont semblables aux stérols fongiques. Les agents qui modifient la synthèse des stérols pourraient donc être des composés antileishmaniens utiles. Une autre voie d'investigation résulte du parasitisme par les leishmanies du SRE de l'homme : les principes actifs qui s'y concentrent pourraient être de bons antileishmaniens. Une voie également envisagée est liée au métabolisme enzymatique particulier de la synthèse des bases puriques et des analogues de ces bases sont essayés comme agents antileishmaniens. Enfin une dernière voie mise sur la stimulation des défenses immunitaires à médiation cellulaire accompagnée d'une thérapie par les agents chimiothérapeutiques classiques. L'utilisation de l'interféron

gamma produit par manipulation génétique est efficace dans le traitement clinique d'enfants brésiliens atteints par des leishmanioses viscérales à *L. donovani infantum* en association avec les sels d'antimoine selon un résultat rendu récemment public par Falcoff et coll.<sup>92</sup>. D'autre part, on a imaginé d'encapsuler les antileishmaniens dans des structures comme les liposomes ou les érythrocytes afin de faciliter leur incorporation dans les macrophages par phagocytose.

#### 1.2.3.3.1. La voie des analogues de la purine

Les trinucleotides puriques (ATP et GTP) sont nécessaires à la formation des acides nucléiques et à la production d'énergie. Or les parasites d'eux mêmes synthétisent peu de nucleotides. Les nucleotides puriques des *Leishmania* dérivent de la phosphorylation de nucleosides ou de bases récupérées de produits de destruction du tissu hôte. Les parasites ont une phospho-transférase purines-nucleosides qui est soit absente soit faiblement active dans les tissus de mammifères. On a donc utilisé cette voie enzymatique pour faire fabriquer à la leishmanie des analogues non fonctionnels des nucleotides qui lui sont utiles et ainsi les tuer sans léser les cellules de mammifères (schéma N °2).

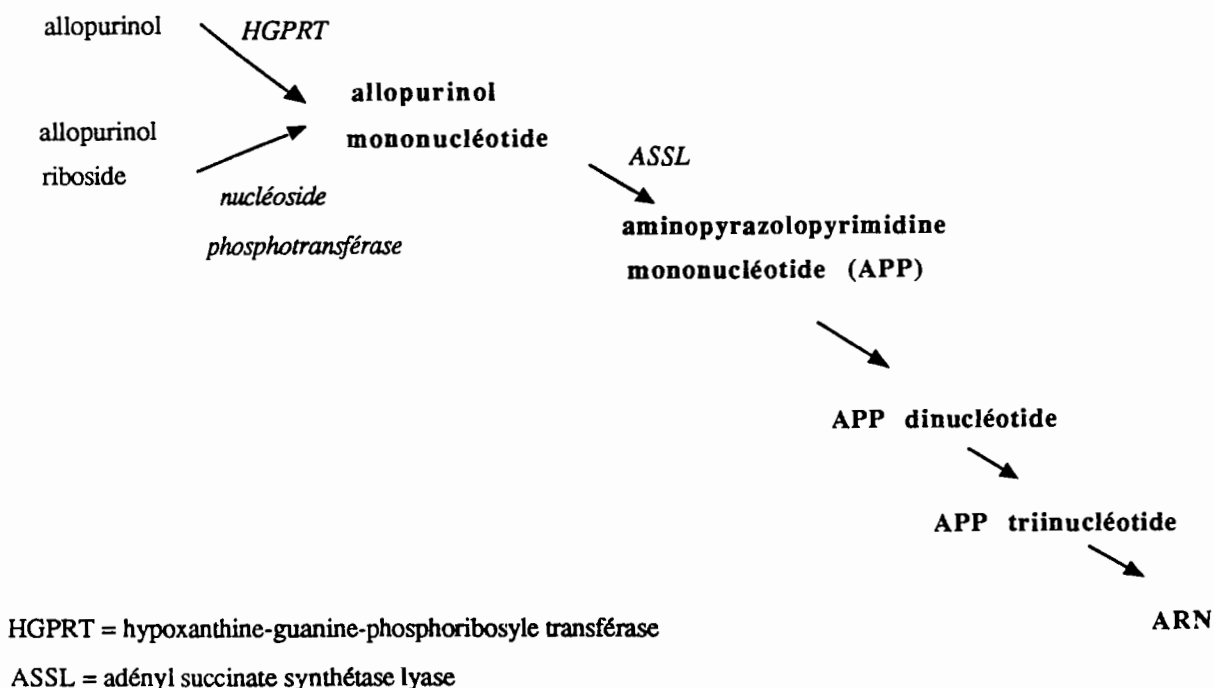
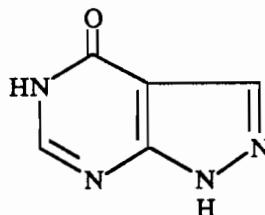


Schéma N°2 : Incorporation métabolique de l'allopurinol et de son riboside à la place de l'hypoxanthine d'après S.L. Croft, TIPS, 1988, Vol. 9, p.376-381

#### 1.2.3.3.1.1. Allopurinol

L'allopurinol (**34**) est un analogue structural de l'hypoxanthine.

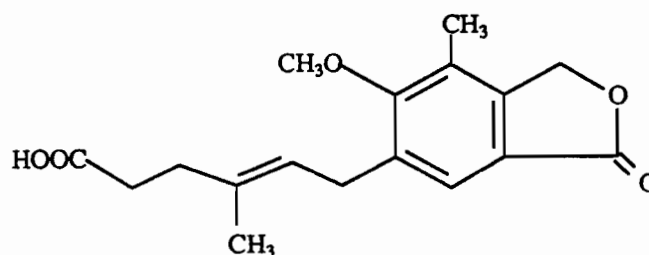


**34** Allopurinol

Dans les cellules de mammifères, l'allopurinol inhibe la formation d'acide urique à partir de l'hypoxanthine. Mais il est également leishmaniostatique pour les promastigotes *in vitro*. Ce composé ainsi que son ribonucléoside sont efficaces sur *Leishmania donovani* dans le modèle du macrophage tumoral de souris<sup>93</sup>. De fortes doses ont montré une activité nette dans la leishmaniose cutanéomuqueuse chez le singe *Aotus*<sup>94</sup>. Une étude préliminaire<sup>95</sup> sur l'effet de l'allopurinol dans le Kala-azar a montré que trois patients sur six qui n'avaient pas été guéris par les sels d'antimoine ont été guéris par une cure d'allopurinol complémentaire. Mais aucun patient n'a été guéri par l'allopurinol seul. Ces résultats suggèrent que l'allopurinol et son ribonucléoside pourraient être des adjuvants utiles aux traitements par l'antimoine.

#### 1.2.3.3.1.2. Acide mycophénolique

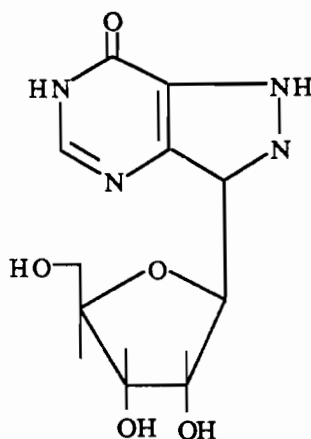
L'action antileishmanienne de l'acide mycophénolique (**35**), un inhibiteur de la synthèse du GTP, a été montrée dans le modèle *in vitro* des macrophages humains parasités par *Leishmania donovani*.<sup>96</sup> Les inhibiteurs de la synthèse du GTP peuvent avoir un potentiel d'agents antileishmaniens.



**35** Acide mycophénolique

### 1.2.3.3.1.3. Formycine B

La formycine (36) est un autre analogue structural de l'inosine. Il est leishmaniostatique pour les promastigotes et leishmanicide (activité à  $0.05 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) pour les amastigotes dans les macrophages humains. La formycine B et la pentamidine sont les composés les plus efficaces dans ce modèle. Mais la formycine B a le meilleur indice thérapeutique de tous les composés testés dans le modèle du macrophage humain *in vitro*. Il est de 25. *In vivo* chez le hamster infecté par *L. donovani*, ce composé est plus actif par voie orale qu'en intrapéritonéal. Mais il semble assez toxique<sup>97</sup> et le rapport activité/toxicité semble insuffisant pour envisager des essais chez l'homme.



**36** Formycine B

### 1.2.3.3.2. Synthèse de l'ergostérol et imidazoles

Les imidazoles, agents antifongiques oraux inhibent la biosynthèse de l'ergostérol (schéma N°3) et ont donc été testés contre les leishmanies. Les concentrations efficaces des différents composés de la série (clotrimazole, miconazole) sont très proches des doses toxiques pour les macrophages humains<sup>98</sup>. Le kétoconazole (33) est très actif à des concentrations supérieures aux taux sériques atteints par une posologie classique en clinique<sup>99</sup>. Son mécanisme d'action est partiellement déterminé : il inhibe la déméthylation des précurseurs de l'ergostérol dans les promastigotes mais il reste à déterminer si elle est à la base de son mécanisme d'action dans les amastigotes et de l'effet antileishmanien constaté *in vivo*. Le kétoconazole donne des résultats contradictoires en clinique<sup>100,101</sup>.

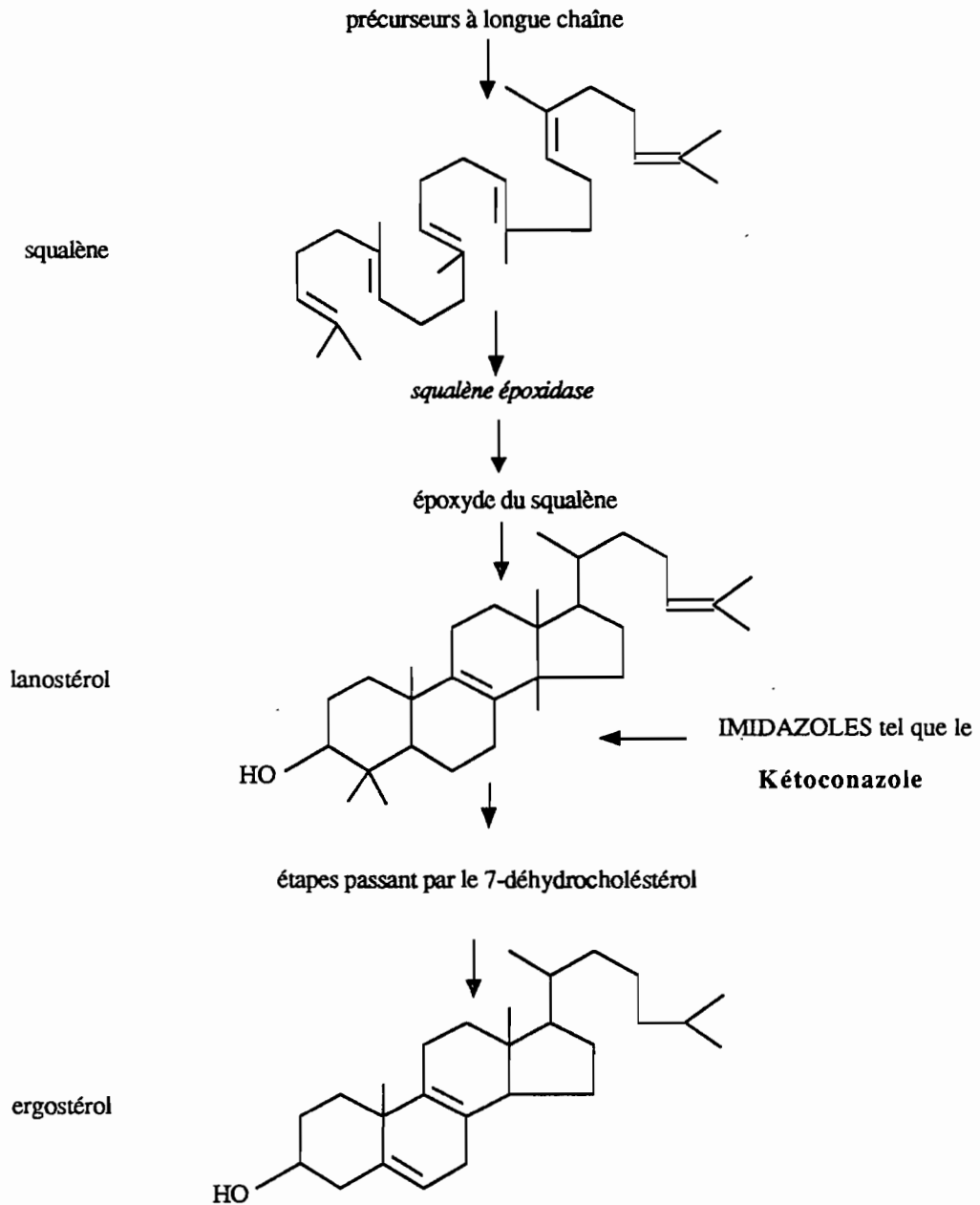
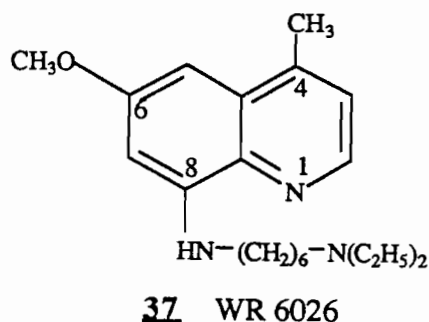


Schéma N° 3 : Voie biosynthétique des stérols chez le genre *Leishmania*  
 et les champignons et son inhibition par les imidazoles d'après S.L. Croft, TIPS, 1988, Vol. 9, p.376-381

#### 1.2.3.3.3. Les Amino-8-quinoléines

Les amino-8-quinoléines sont connus comme antimalariques mais leur concentration dans le foie suggère leur possible efficacité contre les leishmanioses viscérales. On a montré que la primaquine(7) était active contre la maladie viscérale chez l'hamster récemment infecté. Le WR6026, une amino-8-quinoléine (37) avec un méthyl supplémentaire en 4 et une chaîne aliphatique aminée plus longue est non seulement plus active que la primaquine mais environ 500 fois plus active que les sels d'antimoine dans ce modèle et 160 fois plus active contre une infection viscérale plus chronique<sup>102</sup>. Testé sur d'autres animaux atteints de leishmaniose viscérale, dans la leishmaniose cutanée expérimentale et dans les macrophages humains infectés *in vitro*, il continue à être plus actif que les sels d'antimoine. L'effet de ce composé semble augmenté *in vivo* par rapport à l'activité *in vitro*. La démonstration de l'activité clinique du WR 6026 est en cours.



#### 1.2.3.3.4. Les composés emprisonnés dans les liposomes et les érythrocytes

Une approche ingénieuse en chimiothérapie de la leishmaniose provient de la constatation que les leishmanies sont rencontrées à l'intérieur des cellules du S.R.H.. Les composés encapsulés à l'intérieur de transporteurs qui sont eux mêmes phagocytés par le S.R.H. s'y concentreraient pour tuer les parasites en même temps qu'ils seraient isolés du reste du corps qui comprend des organes vis-à-vis desquels la drogue est ordinairement toxique. L'indice thérapeutique serait ainsi augmenté. Mais plusieurs problèmes techniques doivent être surmontés. Le composé doit être introduit à l'intérieur du transporteur et ne doit pas ressortir après introduction.

Le transporteur doit soit fusionner avec les phagolysosomes contenant les leishmanies à l'intérieur des macrophages, soit être digéré par le macrophage de façon à ce que le principe actif soit disponible pour agir sur les parasites. Enfin le transporteur ne doit pas être toxique pour les cellules de mammifères. Le transporteur utilisé actuellement dans les études expérimentales est le liposome. Les composés emprisonnés dans des liposomes se sont montrés très efficaces dans la maladie viscérale du hamster ou de la souris. Ainsi les sels d'antimoine encapsulés sont quatre cents fois plus efficaces que lorsqu'ils sont libres<sup>103</sup>. Le WR 6026, l' amino-8-quinoléine vue précédemment, était cent-soixante fois plus efficace que les sels d'antimoine contre des affections viscérales chroniques. Le WR 6026 encapsulé est lui mille trois cents fois plus efficace<sup>103</sup>. Cependant le taux de mortalité chez les animaux exposés à des liposomes contenant de l'eau physiologique est supérieure à celui d'animaux exposés à la solution saline seule. Les agents récemment développés sont assimilables par la voie orale et donc sont perméables aux membranes et sont donc moins susceptibles de rester à l'intérieur des liposomes. Ce problème technique peut être surmonté par l'utilisation d'enveloppes d'hématies liées à des immunoglobulines G comme transporteur. Les érythrocytes ont des enzymes qui pourraient agir pour interdire le passage aux composés diffusibles. La pentamidine a été ainsi expérimentée *in vitro* avec des résultats comparables aux composés encapsulés dans des liposomes<sup>104</sup>. La formycine B qui elle est diffusible, est phosphorylée par les enzymes de l'érythrocyte et ainsi ne ressort plus<sup>105</sup>.

#### 1.2.3.3.5. La production de radicaux libres et les donneurs d'électron

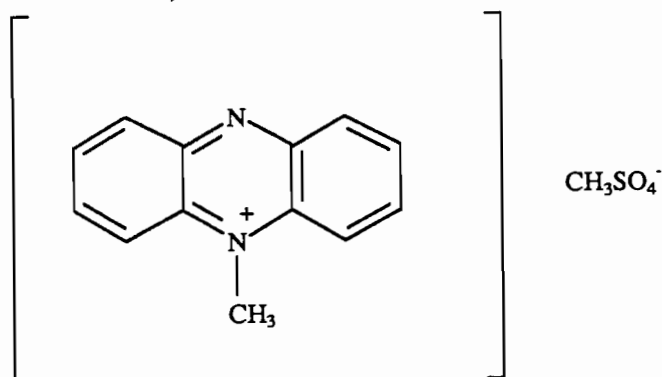
L'existence de métabolites oxygénés produits par des macrophages a été relié à la destruction de micro-organismes intra-cellulaires dans différents modèles *in vitro* <sup>106</sup>. Ces macrophages sont stimulés soit par l'immunité cellulaire, soit par des particules, soit par des drogues actives sur les membranes. Le métabolite prépondérant est l'anion superoxyde ( $O_2^-$ );  $O_2^-$  peut réaliser la dismutation du peroxyde d'hydrogène et ainsi générer d'autres métabolites oxygénés toxiques comme le radical hydroxyle ou l'oxygène singulet. Toute une série de transporteurs d'électrons tel que les phénazines, thiazines et quinones, quand ils sont au contact de cellules vivantes, peuvent être réduits en intermédiaires auto-oxydables. Après réoxydation,

ces intermédiaires peuvent générer des anions superoxyde et de l'eau oxygénée.

Dans les TRYPANOSOMATIDEAE dont font partie le genre *Leishmania*, il existe des équipements enzymatiques spécifiques de ce métabolisme oxydatif ; la super oxyde dismutase (S.O.D.) responsable de la transformation des ions  $O_2^-$  en peroxyde d'hydrogène et en oxygène contient chez ces protozoaires un ion Fe au lieu d'ions Cu, Zn ou Mn pour la S.O.D. des mammifères.

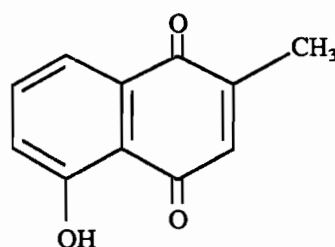
Le cofacteur de la réductase du glutathion ou trypanothione qui est spécifique des TRYPANOSOMATIDEAE est un conjugué de spermidine et de glutathion<sup>107</sup>. Un autre auteur<sup>108</sup> avait déjà suggéré que les polyamines pouvaient jouer un rôle de cible dans cette famille de protozoaires et dans cette hypothèse, la pentamidine interviendrait par ces fonctions aminées terminales dans le métabolisme des polyamines.

Le méthosulfate de N-méthylphénazonium<sup>109</sup> (38) tue les amastigotes dans les macrophages péritonéaux de souris sans dommage apparent pour les cellules hôtes à une concentration intéressante avec une DE50 = 0.19  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (dose efficace 50 ou concentration pour laquelle 50% des parasites sont éliminés).



**38** Méthosulfate de N-méthylphénazonium

La plumbagine<sup>110</sup> (39), une anthraquinone d'origine naturelle, a montré une activité presque aussi intéressante avec une DE50 = 0.42  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Une étude *in vivo* a été effectuée sur la plumbagine qui a montré seulement une faible activité sur la leishmaniose cutanée de la souris infectée par *Leishmania mexicana amazonensis* par voie interne mais une réduction de 80 % des lésions par un traitement par voie externe.



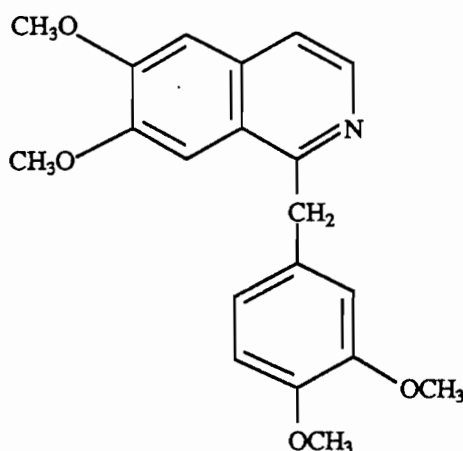
**39** Plumbagine

#### 1.2.3.3.6. Les esters d'acides aminés et *Leishmania mexicana amazonensis*

L'action leishmanicide *in vitro* d'esters d'acides aminés et dipeptides, sur les amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* infestant des macrophages péritonéaux de souris a été montrée par Rabinovitch<sup>111</sup>, en particulier les esters méthylique de la leucine et du dipeptide leucine-méthionine sont actifs. La cible métabolique des esters d'acides aminés correspond aux amastigotes eux-mêmes sans métabolisation par les macrophages hôtes<sup>112</sup>. Ces composés agissent en quelques minutes *in vitro* en se concentrant dans les lysosomes des amastigotes ou mégasomes où le pH acide et l'action de cystéine-protéases permet l'hydrolyse de ces esters d'acides aminés et l'éclatement des mégasomes, ce qui entraîne la désintégration des cellules. Les leishmanies contenant cette cystéine-protéase comme celles du complexe "*mexicana*" sont affectées dans leur survie. Ces esters injectés en intralésionnel ont une activité intéressante *in vivo* sur l'infection cutanée de la souris balb/C par *Leishmania mexicana amazonensis* sans toxicité notable pour l'hôte<sup>113</sup>.

#### 1.2.3.3.7. Les inhibiteurs de la phosphodiesterase de l'AMP cyclique

L'importance du monophosphate cyclique de 3'-5'adénosine comme médiateur cellulaire de nombreuses hormones permet de considérer que des substances pharmacologiques actives doivent interagir avec son métabolisme<sup>114</sup>. Dans ce travail, il est signalé que plusieurs substances antiparasitaires inhibent la phosphodiesterase responsable de l'ouverture de l'AMP cyclique dont l'amphotéricine B. Cette constatation a été suivie d'un travail sur la mesure de l'effet de l'AMP cyclique sur la transformation et la multiplication de *Leishmania tropica* et de *L. donovani in vitro*<sup>115</sup>. La concentration intracellulaire d'AMP cyclique augmente de façon importante (concentration multipliée par quatre) sous l'effet d'inhibiteurs de la phosphodiesterase comme la caféine ou la papavérine (40).

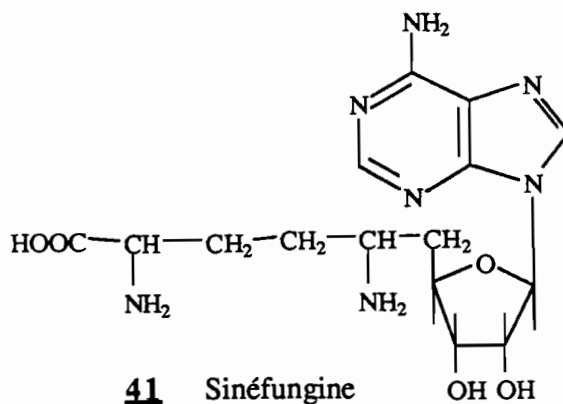


**40** Papavérine

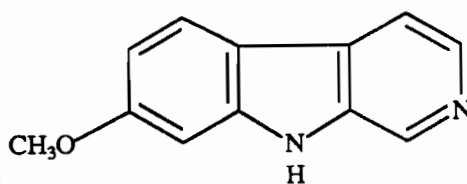
La transformation d'amastigotes en promastigotes est inhibée chez *L. donovani* et la multiplication des leishmanies chez *L. tropica* est réduite de 50 % toujours sous l'effet des inhibiteurs de la phosphodiesterase. L'accumulation de l'AMP cyclique intracellulaire est considérée comme responsable de ces effets sur la transformation et la multiplication des *Leishmania*. Par contre, toujours suivant Walter <sup>116</sup>, la multiplication des amastigotes de *L. donovani* à l'intérieur des macrophages de hamsters n'est pas inhibée. Hansen et coll.<sup>117</sup> ont montré sur la surface membranaire des leishmanies la présence de deux récepteurs de l'adénosine. Ces deux récepteurs ont un effet sur l'activité de l'adénylate cyclase membranaire et sur la concentration intracellulaire de l'AMP cyclique de *L. mexicana mexicana*. Dans la partie résultats, nous verrons que certains composés isolés des plantes présumées leishmanicides pourraient avoir un mécanisme d'action leishmanicide de ce type.

#### 1.2.3.4. Recherche d'antileishmaniens d'origine naturelle

La sinéfungine (41) est un nucléoside naturel produit par *Streptomyces griseolus* et par *Streptomyces incarnatus* dont l'activité antileishmanienne a été montrée à des concentrations de l'ordre de la  $\mu\text{M.l}^{-1}$ , dans un premier temps sur les promastigotes de quatre espèces de leishmanies : *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* <sup>118</sup>, puis sur *L. enrietti* <sup>119</sup>. La sinéfungine inhibe très fortement la synthèse de l'ADN des promastigotes de *L. donovani* <sup>120</sup>. Ce nucléoside possède malgré une activité confirmée *in vivo* sur la leishmaniose expérimentale de la souris<sup>121</sup>, une toxicité rénale importante chez le chien<sup>122</sup>.



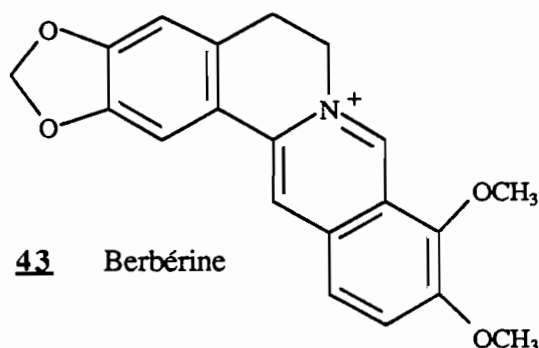
Des quassinoides ont montré une activité sur les promastigotes de *L. donovani in vitro*<sup>123</sup>. Mais aucune confirmation d'activité *in vivo* n'a suivi cette constatation de cytotoxicité. L'harmaline (**42**), alcaloïde tryptaminique a été testé *in vitro* et *in vivo* sur *L. mexicana amazonensis*<sup>124</sup>. L'activité *in vitro* se situe autour de  $100 \mu\text{M.l}^{-1}$  pour la DE50. L'activité *in vivo* la plus intéressante a été constatée par voie orale avec une DE50 de  $47 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Toutefois, la toxicité par la voie sous-cutanée est de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  (dose létale 80). Les auteurs suggèrent une similitude structurale entre les alcaloïdes tryptaminiques et les acides aminés aromatiques nécessaires à la survie des leishmanies pour expliquer le mécanisme d'action de ces composés.



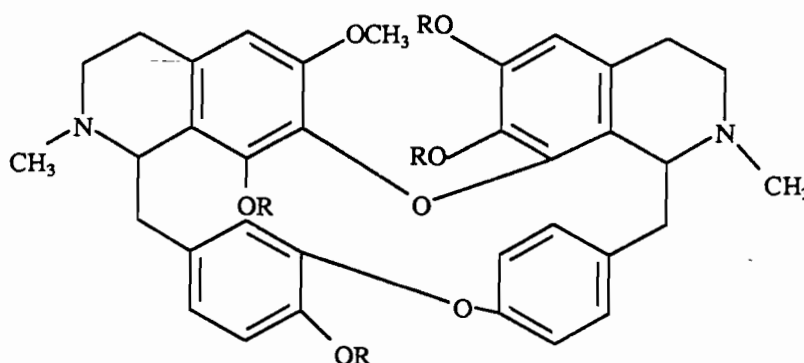
**42** Harmaline

La berbérine (**43**), chef de file des alcaloïdes protoberbériques, isolée de nombreuses familles botaniques (ANNONACEAE, MENISPERMACEAE, BERBERIDACEAE, RUTACEAE, RENONCULACEAE), est signalée comme protozoocide dans la plupart des revues concernant les alcaloïdes benzylisoquinoléiques<sup>125</sup>. Suivant une équipe indienne<sup>126</sup>, elle est leishmanicide sur les amastigotes de *L. donovani* infectant les macrophages *in vitro* et active *in vivo* sur la

leishmaniose viscérale du hamster.



D'autres alcaloïdes isoquinoléiques (**44**) (alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiques) ont été testés récemment par l'ORSTOM et l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude en association avec les laboratoires de pharmacognosie des Facultés de Pharmacie de l'Université Paris-Sud et d'Angers<sup>127</sup>. Ils sont actifs sur les promastigotes de trois espèces de *Leishmania*, *L. donovani*, *L. mexicana amazonensis*, *L. braziliensis*, représentant les différentes pathologies de la leishmaniose. Trois d'entre eux (la gyrocarpine, la daphnandrine et l'obabérine) semblent avoir une activité plus intéressante (inhibition de 50 % de la multiplication des parasites pour des concentrations de l'ordre de 10 à 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Ce résultat doit être confirmé *in vivo*.



**44** Alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiques avec R = H et/ou R = CH<sub>3</sub>

**2. PROTOCOLE DE RECHERCHE A BASE  
D'ETHNOPHARMACOLOGIE SUR DES  
PLANTES MEDICINALES  
ANTIPARASITAIRES DES GUYANES**

## 2.1. INVENTAIRE DES PLANTES MEDICINALES

L'inventaire des plantes présumées antiparasitaires ne peut être séparé d'un inventaire global des pratiques médicinales à bases de plantes auprès d'un groupe donné de population. Une étude générale des pratiques médico-religieuses est mieux comprise et acceptée par les informateurs. Notre méthode occidentale de parcellisation de la connaissance ne fait pas partie de leur conception globalisante de la nature, le rapport de confiance est alors difficile à établir et le travail résultant est souvent entaché d'erreurs par la volonté du chercheur qui sortant l'information de son contexte, risque de la dénaturer. La méthodologie d'inventaire de plantes soignant les parasitoses sera présentée ici à l'occasion de l'étude complète d'une pharmacopée, celle des Saramaka du Surinam. L'expérience d'inventaire des pharmacopées traditionnelles par l'Unité de Recherche spécialisée du Département Santé de l'ORSTOM a été notre guide dans ce domaine.

La géographie humaine des Guyanes est riche en groupes aux traditions culturelles originales. En Guyane française, quatre groupes d'amérindiens, trois groupes de Noirs Marrons et la population créole composent l'essentiel des populations installées depuis plusieurs siècles sur le territoire et en contact permanent avec le milieu végétal<sup>128</sup> (figure N°3).

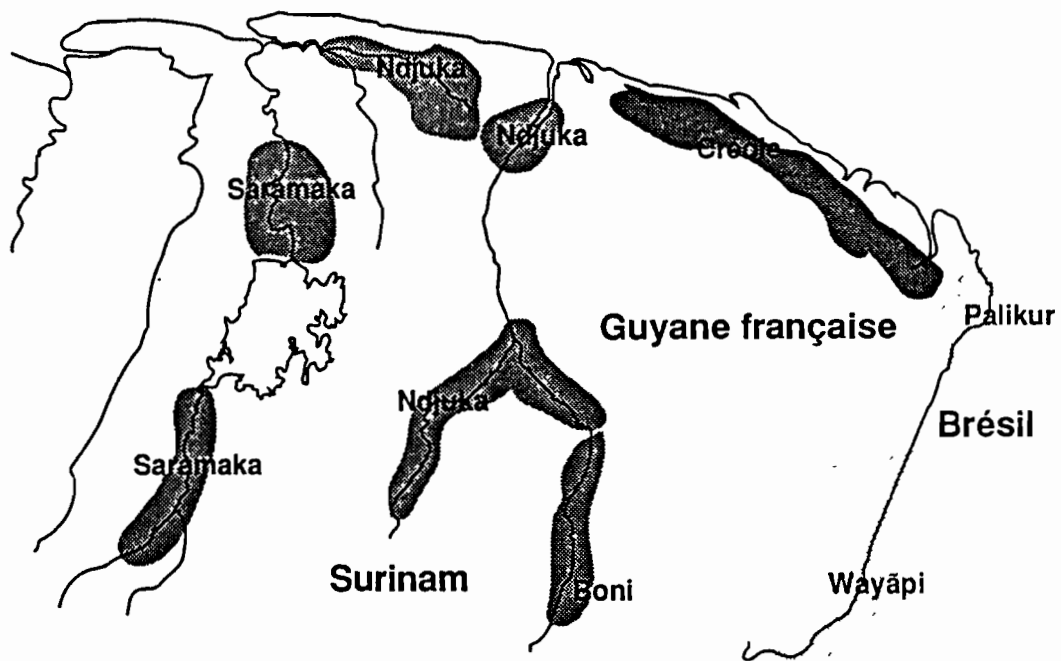


Figure N 3 : Carte de répartition des groupes ethniques de Guyane française et du Surinam pour lesquels un relevé des plantes antiparasitaires a été effectué

La médecine et le savoir médicinal des groupes indiens et créoles a fait l'objet d'une étude multidisciplinaire complète résumée dans un ouvrage de synthèse<sup>129</sup>. L'inventaire s'est élargi aux groupes de Noirs Marrons de Guyane et du Surinam et certaines plantes présumées antiparasitaires sont analysées dans le cadre de ce travail pour la première fois dans l'ensemble de leurs aspects, ethnobotanique, chimique et pharmacologique.

### **2.1.1. Ethnopharmacologie guyanaise**

#### **2.1.1.1. Méthodes de l'ethnobotanique appliquée à une ethnie : les Saramaka**

Il existe quatre groupes principaux de Noirs Marrons répartis essentiellement sur le territoire du Surinam avec une extension territoriale sur le Maroni en Guyane française. Il s'agit des Saramaka, des Ndjuka, des Boni ou Aluku et des Paramaka. L'habitat de ces populations est la forêt tropicale humide. Ils colonisent les bords des rivières de l'intérieur, voies de pénétration dans la forêt et ont un mode de vie où l'eau et la forêt jouent des rôles déterminants. La constitution de leurs groupes remonte au 17<sup>ème</sup> siècle : la fuite des esclaves d'origine africaine des plantations de l'ex-Guyane Hollandaise, le Surinam actuel, en est la première étape. Pendant les premiers temps de leur vie dans la forêt, ils ont été soumis à la pression d'une longue guérilla avec les colons hollandais et leurs mercenaires anglais<sup>130</sup>. Leur genèse s'achève au 18<sup>ème</sup> siècle avec le passage du dernier groupe constitué en Guyane Française, les Boni ou Aluku, chassés à la fois par les Hollandais et les Ndjuka. La constitution récente de ces groupes, moins de trois siècles pour le plus vieux, autorise à penser que leurs connaissances du monde végétal ont des origines variées avec des emprunts nombreux.

L'information concernant l'usage médicinal des plantes sauvages ou domestiques a été collectée chez les Noirs Marrons Saramaka. Les plantes sur lesquelles ont été réunies des informations sont celles récoltées le plus systématiquement. La répétition des collections permet la meilleure corrélation possible entre les deux savoirs :

- \* le savoir botanique d'une part, dont les critères taxonomiques sont souvent très précis,

- \* le savoir ethnobotanique d'autre part, dont la précision est dépendante de la richesse du taxon en caractères reconnus par l'informateur et plus généralement par le groupe ethnique

étudié. C'est ce degré d'approximation qui doit être précisé. Il faut éviter l'élimination de certaines connaissances traditionnelles qui semblent approximatives, même si elles ne recouvrent pas exactement un taxon botanique particulier ; la répétition des collections éliminent la possibilité d'une perte d'informations. Les plantes récoltées sont photographiées au préalable dans leur milieu naturel et une iconographie appropriée est réunie permettant l'illustration des monographies.

La connaissance du monde végétal et son utilisation paraît partagée entre toutes les catégories de la population : hommes et femmes, surtout les plus âgés. Certains savoirs sont plus spécialisés et plus secrets. Le recueil de l'information, en particulier les longues tournées en forêt, a nécessité le paiement des informateurs pour le travail fourni. L'argent venu de la côte, des *bakaa* (primitivement les colons blancs ; maintenant tout étranger aux groupes de Noirs Marrons) a une importance considérable pour ces sociétés. Le souci de bénéfices pécuniers pouvait déformer l'information. Mais l'utilisation d'informateurs différents a permis d'éliminer autant que possible les pures inventions.

Des informateurs de deux villages (*Banafokondre* et *Amakakondre*) et de deux lignages différents (*Nasi* et *Matchao*), qui sont les deux lignages dominants en nombre et en importance politique du monde saramaka ont contribué à l'établissement de l'inventaire. Les informateurs avaient une moyenne d'âge d'environ cinquante ans ; presque tous des hommes, d'où la collecte d'un petit nombre de remèdes concernant les soins de la parturiente et de l'enfant, remèdes utilisés par les femmes. Dans un rapport monétaire, ce travail réalisé uniquement avec les hommes est presque obligatoire car ce sont eux qui manipulent l'argent. L'importance du rang et l'âge, mais *a contrario* une volonté très nette de notre part d'éviter les pièges politiques, ont assuré du travail aux personnages les plus importants des deux villages : *Kabitèni* ou chef de village, *Basia* ou homme de police, *Obia man* ou homme médecine, mais aussi les hommes des foyers les plus importants et ceux qui estimaient avoir quelque chose à échanger.

L'utilisation d'informateurs traducteurs étant nécessaire, a amené une perte dans le recueil de l'information. La langue Saramaka est fixée par la politique de scolarisation menée depuis une trentaine d'années et des dictionnaires existent<sup>131,132</sup> à l'usage des nombreuses missions religieuses qui agissent au Surinam. L'origine anglaise et surtout portugaise de nombreux mots

usuels, a permis des recherches étymologiques relativement aisées. La langue est un dialecte créole au sens anglo-saxon du terme, dérivé de l'anglais et du portugais des colons auquel s'ajoutent des mots des langues Kongo, Ashanti ou Bantu de l'Afrique de l'Ouest. Price<sup>133</sup> propose la répartition lexicale suivante chez les Saramaka : origine anglaise = 20% ; origine portugaise = 20% ; origine hollandaise et amérindienne = 10% et origine africaine = 50%. Mais le lexique courant a une prédominance anglo-portugaise. La retranscription des noms de plantes et de maladies utilise la transcription phonétique mis en place par Donicie<sup>131</sup>

#### 2.1.1.1.1. Classifications pharmacognosique et ethnobotanique Saramaka

##### 2.1.1.1.1.1. Les saveurs

La perception des saveurs des plantes semble correspondre aux choix thérapeutiques des tradipraticiens saramaka, à une certaine division sexuelle de la société et bien sûr aux choix alimentaires de ces populations sylvoles. En ce qui concerne le goût amer, on ne constate pas nécessairement une relation entre cette saveur et une activité biologique ou une éventuelle toxicité. Ainsi, l'hypothèse, couramment admise, de la détection par les mammifères des substances toxiques végétales par leur caractère amer, doit être considérée avec précaution<sup>134</sup>. De même, certains principes actifs très toxiques présents dans les végétaux ne présentent pas d'amertume, par contre des légumes comme les fruits de *Mormandica charantia* CUCURBITACEAE excessivement amers, font parties de l'alimentation des peuples tropicaux et en particuliers de celle des groupes ethniques du Surinam.

L'appréciation des saveurs alimentaires amères et sucrées chez les Saramaka est corrélée avec la division entre les sexes à l'âge adulte. En effet, les remèdes de la virilité et ceux pour les maux de ventre absorbés par voie orale sont considérés comme d'autant plus puissants qu'ils sont plus amers et sont donc très prisés des hommes. Il est fréquent que dans la médecine d'entretien quotidien, les hommes absorbent des macérations dans l'alcool de plantes à principes amers (par exemple les SIMAROUBACEAE). Ils le font avec forces grimaces et expriment leur satisfaction de savoir les boire. D'autre part, ils ont un profond rejet des aliments sucrés qui sont dit être réservés aux femmes et aux enfants. On peut noter que dans ce peuple

contrairement à beaucoup d'autres ethnies, le caractère amer ne correspond pas à la propriété de plante fébrifuge.

#### 2.1.1.1.1.2. Taxonomies végétales chez les Saramaka

Il est absurde de penser qu'un système univoque (semblable à celui du savoir botanique scientifique) permet aux Saramaka de nommer et de reconnaître les plantes. Ce lexique est avant tout utilitaire, il permet de se rappeler des multiples usages des plantes et aide à leur reconnaissance :

- l'aspect anatomique est pris en considération dans la grande part des noms vernaculaires (33%): arbre (*pao*), herbacée et arbuste (*wii*), liane (*tataj*), épineux (*maka*), grand (*gaan*) et petit (*piki*) entrent dans la composition des noms de plantes,
- l'usage médicinal des plantes ou le caractère toxique génèrent des noms : *konsaka wi* : herbacée utilisée pour la dermatose du même nom ; *sua wi* : la feuille qui fait gonfler, plante toxique dont l'ingestion des fruits fait gonfler la langue,
- on consacre des plantes à des entités surnaturelles : *ampuku tataj* : la liane de l'esprit *ampuku* , qui sert aux rituels d'apaisement de cet esprit de la forêt,
- une observation de type écologique peut donner une appellation : le fruit mangé par tel poisson, ce qui permet d'ailleurs de l'utiliser pour la pêche, l'arbre qui est l'abri habituel d'un animal : *kwatakaman* : la chambre du singe Atèle (*Ateles panicus*),
- des analogies morphologiques avec des animaux : *akami kini* ( les genoux de l'akami) arbuste dont les noeuds rappellent les articulations noueuses de l'oiseau *Agami*,
- des rappels de la saveur ou de la couleur dominante de la plante en rapport avec leurs usages: *bita pao* arbre amère ; *bè baka pindja pao* : arbre tacheté au dos rouge, allusion au latex rouge de cet arbre utilisé contre certaines dermatoses.

Une grande part des plantes utilisées (39% ) sont récoltées dans des zones faciles d'accès (rudérale, d'abattis, de forêt secondaire, ripicole) permettant une utilisation aisée qui ne nécessite que peu de moyens de conservation. Les plantes plus rares comme certaines lianes ou arbres (récoltées en forêt primaire, soit 21%) sont utilisées surtout à partir de leurs organes durables et aisément transportables (bois et écorce).

#### 2.1.1.1.1.3. Parties de plantes utilisées

Les organes les plus utilisés sont les parties feuillées des arbustes, les écorces de troncs des grands arbres, la plante entière dans le cas de plantes de petites tailles (épiphytes, herbacées), les racines plus rarement ; la difficulté de l'extraction de ces dernières et leurs formes leurs donnent souvent des pouvoirs en rapport avec la force, la virilité. La facilité d'approvisionnement oriente aussi le choix des récolteurs.

#### 2.1.1.1.1.4. Préparations

les modes les plus fréquents de traitements des drogues végétales sont :

- les macérations dans l'eau et le rhum
- les décoctions
- la récupération de la sève par pressage, du latex par lavage, de l'écorce par grattage ou broyage.

#### 2.1.1.1.1.5. Administration des traitements

- Le mode le plus usuel est le bain (*washi* ; 31%) qui doit être considérée plus comme une ablution qu'un véritable bain dans le sens européen. Ce bain s'additionne en général d'une prise orale réduite de l'eau de la décoction ou de la macération. C'est la préparation principale pour les problèmes dermatologiques, les fièvres, les refroidissement et aussi pour les usages rituels. Ce type d'administration semble généralisé dans les populations sylvoles comme le note Grenand et coll.<sup>129</sup>,
- la voie orale (*dingi* ; 31%) qui sert essentiellement dans les désordres de type digestif (diarrhées, vers, ...),
- les cataplasmes et onguents en complément des bains pour les problèmes liés à la peau,
- les voies nasale et oculaire pour les désordres liés à la tête et la vision,
- les bains de vapeur de plantes odorantes, intermédiaires entre le bain et la prise nasale surtout

pour les refroidissements et les fièvres.

#### 2.1.1.1.2. Apport de l'anthropologie médicale

Aucun travail notable en ethnomédecine n'existe sur les Noirs Marrons, si ce n'est celui du Dr Janssen<sup>135</sup>(1961) sur la santé des enfants de Marrons qui introduit un petit lexème de maladies. Le travail du Dr Sausse déjà cité concernant les populations Wayana et Aluku du Haut Maroni donne un aperçu très succinct, des types d'affection les plus fréquents chez les Aluku ou Boni.

##### 2.1.1.1.2.1. Les causalités de la maladie

##### *2.1.1.1.2.1.1. causalités profondes*

Dans un monde où le végétal, l'animal et l'humain n'ont pas de frontières distinctes, où rien ne doit être laissé au hasard, la causalité spirituelle de la maladie est primordiale ; elle reste l'affirmation dernière après toute tentative rationalisante d'explication des maux. Sorcellerie, perturbations des esprits de la forêt, des esprit des morts, des ancêtres guerriers sont susceptibles de provoquer l'apparition de la maladie. Des cycles complexes de rituels liés aux travaux de l'abattis, aux rapports sociaux (surtout lignagers) préviennent ou guérissent les maladies. Une autre explication complémentaire du rapport au corps et à la santé des Saramaka peut être trouvée dans leur tradition historique orale qui montre une grande importance des rites d'invulnérabilité, de résistance à la faim et à l'effort physique. Ce furent les conditions indispensables de leur capacité à vaincre le colonisateur dans sa tentative de les réduire de nouveau à l'esclavage ou à la mort. Ils existent donc des spécialistes des remèdes de l'invulnérabilité, des traumatismes graves. Il faut noter que l'on préfère arracher de l'hôpital un malade atteint de fractures, en allant le récupérer si nécessaire jusqu'à Paramaribo, la capitale du Surinam, pour le soigner en milieu traditionnel.

##### *2.1.1.1.2.1.2. nosologie pratique des Saramaka*

Avant, pendant et parfois après la tentative d'explication " surnaturelle ", une classification plus naturaliste du savoir médical est disponible. Cette classification est intimement liée à la compréhension que les Saramaka se font de leur propre corps et de son fonctionnement : l'individu Saramaka se considère comme parcouru par un flux vital qui est le sang qu'il ne faut pas répandre et dont il faut éviter le contact. Son système digestif est un long tube sans poche par lequel pénètrent tous les flux vitaux externes : aliments, eau et air. Le cœur et l'estomac sont confondus. Les problèmes d'ulcères sont traités comme des problèmes cardiaques et l'asthme comme phénomène digestif. Le froid peut pénétrer comme chez les Ndjuka par toutes les ouvertures (bouche, anus, sexe, membres et tête) et il peut être mis en parallèle avec la nature des esprits des morts (*koto sembe* = hommes froids, traduction littérale) qui eux aussi peuvent vous pénétrer par les mêmes ouvertures. Les connaissances de l'anatomie et des pathologies tropicales, d'un médecin dermatologue ayant participé aux enquêtes, a permis de mieux discerner quelles affections se cachaient derrière le langage souvent imagé, parfois imprécis des tradipraticiens.

#### 2.1.1.1.2.1.3. *connaissance de type occidentale des agents des maladies*

Dans la population non scolarisée, ce savoir est très limité voire inexistant. Toutefois, l'étiologie des maladies sexuellement transmissibles semble comprise et des catégories d'helminthes différenciées (*singaasi bitchu*, *ascaris* ; *bisi bisi*, *taenia* et *wolo*, non identifié). La pression thérapeutique des agents de santé des dispensaires, uniquement basée sur le dépistage et le traitement du paludisme sans réel souci, du point de vue des Saramaka, des autres éléments de leur santé, leur ont fait acquérir d'une part une certaine prise de conscience du paludisme, mais d'autre part ont entraîné des réactions de rejet des traitements proposés.

#### 2.1.1.2. La notion traditionnelle de paludisme : les fièvres intermittentes

Le critère principal retenu par les grands programmes de tests de plantes médicinales présumées antipaludiques dans des zones d'endémie palustre, est la propriété de fébrifuge. Les rythmes quotidiens des accès palustres et annuels des épidémies de paludisme (saison des

fièvres correspondant à la saison sèche) sont perçues par les populations de Noirs Marrons du Maroni. La population amérindienne palikur fait la même rapprochement entre la pullulation saisonnière des anophèles et l'apparition des fièvres<sup>129</sup>. Les auteurs se demandent avec raison, si cette constatation des indiens n'est pas d'introduction récente liée à la lutte anti-vectorielle et à la chimioprophylaxie antipaludique pratiquées par les autorités sanitaires des régions concernées. Chez les Wayāpi, autre groupe amérindien de Guyane, la fièvre est considérée comme très fréquente et parfois liée au paludisme. D'autre part, il a été observé dès les années cinquante, une forte prévalence du paludisme dans ces populations sylvoicoles, véritable réservoir humain de la parasitose<sup>9</sup>. Quant aux créoles, le mot même de malaria ou de paludisme en fonction de l'origine anglophone ou francophone des populations immigrées, est passé dans le langage commun probablement sous l'influence des structures sanitaires coloniales de la côte.

#### 2.1.1.3. La notion traditionnelle de leishmaniose : lésions cutanées persistantes et caractéristiques

La leishmaniose en Guyane est reconnue comme une entité nosologique par toutes les populations de la Guyane et chaque groupe culturel lui donne un nom. Chez les Noirs Marrons Ndjuka et Boni, le nom illustre l'écologie de la maladie : *buchi jasi* ou bouton de la forêt. Il en est de même pour les populations créoles de Guyane, la leishmaniose cutanée est désignée du nom de pian bois ou maladie de la forêt, le mot pian signifiant à la fois puant et désignant un petit animal de la forêt à odeur désagréable, *Didelphis marsupialis*<sup>129</sup>. La lésion est souvent surinfectée en raison de la longue durée nécessaire à la cicatrisation et dégage alors une odeur putride. Dans le nom de *tataj jasa* donné par les Saramaka, le mot *jasa* se rapproche du *jasi* ou bouton des autres Noirs Marrons et *tataj*, la liane fait probablement allusion à l'origine forestière de la maladie. Les Wayāpi insistent sur le caractère important de la lésion, le nom de *kalasapau* signifiant grand abcès par rapport aux abcès provoqués par d'autres causes. Les Palikur donnent une appellation semblable dans son étymologie à celle des créoles, *yatuwe* désignant à la fois *Didelphis marsupialis* et la leishmaniose<sup>129</sup>.

#### 2.1.1.4. Limites de l'ethnopharmacologie : systèmes médicaux issus de cultures différentes

La chance de trouver un principe actif réellement efficace issu d'une plante médicinale est liée au choix des affections ciblées par cette recherche. Les populations dites primitives ont des dons d'observation très développés dûs à leur vie dans un milieu hostile où il est primordial pour survivre, de savoir distinguer les fruits comestibles, d'apercevoir et de traquer le gibier, de sélectionner les plantes médicinales parmi des plantes toxiques ou sans intérêt. Ce discernement se retrouve dans la capacité de distinguer des affections dermatologiques en fonction de leurs aspects respectifs avec une précision peu courante digne d'un dermatologue<sup>136</sup>. Par contre, d'autres maux ont pour les populations tribales une nosologie plus floue, la description des symptômes internes en particulier est souvent éloignée de la conception médicale la plus simple et des interventions extérieures (esprits surnaturels, fluides, sorcelleries) sont souvent mises en avant pour justifier voire décrire les maladies de l'intérieur du corps. En fonction des résultats de l'étude éthnomédicale pratiquée sur un groupe culturel donné, il est possible de discerner ce qui dans la médecine traditionnelle procède d'une lecture naturaliste de la maladie et qui peut être le mieux rapproché de notre conception de la maladie. Il est ainsi possible en fonction du contexte médical du lieu de choisir des maladies et donc les tests appropriés mettant en évidence l'activité de plantes médicinales. Autrement, ce criblage s'apparente à une entreprise hasardeuse.

### **2.1.2. La récolte et l'identification botanique des plantes**

La forêt du plateau des Guyanes est d'un accès difficile, les seules voies importantes de communication vers l'intérieur sont les fleuves, hormis quelques lignes d'avions desservant les principales communes. La forêt guyanaise est très riche en espèces végétales : les seuls végétaux supérieurs sont estimés à environ six mille espèces. Il existe une grande hétérogénéité spécifique et les peuplements monospécifiques sont souvent restreints en quantité et dispersés. Le choix des espèces à tester se fera en partie sur des critères liés à la répartition et à l'abondance de l'espèce sélectionnée donc aux facilités de récolte et de réapprovisionnement. La constitution de collections d'herbiers pour chaque récolte de plante en vue d'une utilisation pharmacochimique est indispensable. Car l'identification exacte des espèces tropicales est réservée aux seuls spécialistes. La possibilité de retrouver une activité sur un nouveau lot de

drogue végétale est liée en premier lieu à la récolte de la bonne plante. Pour assurer un identification rapide et sure, le centre ORSTOM de Cayenne dispose d'un herbier. La quantité des échantillons d'herbiers récoltés (environ cinquante mille) pour trois mille huit cents espèces de phanérogames et de ptéridophytes identifiées et présentes dans l'herbier, la qualité de la conservation des échantillons, la gestion rapide de ces échantillons qui sont envoyés aux spécialistes mondiaux de taxonomie botanique font de l'herbier un outil très opérationnel<sup>137</sup>. De plus l'informatisation des collections sous la forme d'une banque de données appelée "AUBLET" permet maintenant d'obtenir un suivi rapide et actualisé de l'identification des échantillons récoltés<sup>138</sup>. La consultation des collections à partir d'un serveur informatisé permettra dans un futur proche un accès plus rapide aux nouvelles identifications des collections. La taxonomie botanique est imprécise dans ces régions tropicales mal connues où la découverte d'espèces nouvelles est fréquente.

## 2.2. TESTS BIOLOGIQUES DE MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES DANS DES EXTRAITS DE PLANTES

La recherche des principes actifs extraits de plantes est guidée entièrement par les résultats des tests biologiques spécifiquement choisis. Des tests sur cultures cellulaires de parasites sont disponibles depuis quelques années pour les protozoaires en particulier les parasites du paludisme humain. Toutefois certaines molécules antipaludiques comme le proguanil et l'amodiaquine ne sont actifs qu'après métabolisation<sup>25</sup> et donc les modèles *in vitro* risquent de donner un faux négatif pour des molécules de ce type, ou des prodrogues. Les tests *in vitro* donnent surtout de nombreux faux positifs dus à des cytotoxicités non spécifiques. Les extraits et surtout les molécules toxiques dans ces modèles parasitaires peuvent toutefois par souci de rentabiliser le criblage, être testés secondairement sur d'autres modèles pharmacologiques tels que les cellules tumorales, les bactéries, les champignons, etc...

### 2.2.1. Mise en évidence d'une activité antipaludique

#### 2.2.1.1. In vitro

Cette activité est dans un premier temps évaluée *in vitro* par le biais d'un test d'inhibition à 96 heures. La concentration est choisie en fonction de l'activité *in vitro* sur la culture de *Plasmodium falciparum* du principal antipaludique naturel, la quinine (D.E. 50 = 0.18  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )<sup>139</sup>. Un extrait alcoolique ou aqueux d'une drogue végétale est la forme galénique courante d'utilisation populaire des plantes médicinales. En se reportant aux concentrations de la quinine dans les *Cinchona* sauvages des Andes (de l'ordre de quelques pour cent <sup>140</sup>) et à son activité *in vitro*, les extraits totaux alcooliques des plantes présumées antipaludiques (0,1 à 1 % de substance active) sont testés à la concentration de 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Les extraits ayant montré une inhibition supérieure à 70 % de la parasitémie, sont retenus pour une recherche d'activité ultérieure.

Dans une mise au point sur les méthodes de triage d'extraits de plantes présumées antipaludiques, O'Neill et coll.<sup>141</sup> montrent en testant *in vitro* sur *P. falciparum* des extraits éthanoliques d'*Artemisia annua* et *A. vulgaris* que l'activité antipaludique est concentrée dans *A. annua* qui contient l'artémisinine avec une DE50 de 3,9  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  alors que *A. vulgaris* qui n'en contient pas, a une très faible activité (DE50 de 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Dans la méthodologie de

cette expérimentation, les concentrations des extraits éthanoliques de végétaux ont été respectivement de  $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$  à  $0,005 \mu\text{g.ml}^{-1}$  testés en dilution de raison  $10^{-1}$ .

#### 2.2.1.2. In vivo

L'activité antimalarique est testée *in vivo*, par le biais du test suppressif de 4 jours dans le cadre du paludisme expérimental du rongeur à *Plasmodium yoelii*. Si il y a activité antipaludique, une DE50 est établie. Dans les essais mis en place pour cette étude, la chloroquine à  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  donne une inhibition de 100 % de la parasitémie à J5.

Un parasite associé, *Eperythrozoon coccoides*, peut troubler le bon déroulement de l'expérimentation en provoquant une stimulation des défenses immunitaires de la souris croisée avec celle provoquée par les plasmodium. Cela accentue le caractère erratique des parasitémies et augmente le temps de survie des souris. Dans nos expérimentations, une parasitose associée a été soupçonnée. Les souris receveuses des parasites ont alors été traitées simultanément avec un arsenical, la néoarsphénamine qui tue les rickettsies sans trop toucher les *Plasmodium*. Le traitement est répété sur plusieurs passages de la souche et ensuite les parasites du paludisme ne sont inoculés qu'à des animaux jeunes fraîchement arrivés dans l'animalerie pour éviter toute recontamination.

Dans un essai portant sur l'activité antipaludique de différents extraits de polarité croissante, une équipe africaine précédemment citée<sup>56</sup> utilise des doses maximales de  $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  en solubilisant les extraits dans l'eau additionnée de polysorbate (tween 80). Le test des extraits éthanoliques de plantes brésiliennes du genre *Potomorphe*<sup>46</sup> s'effectue par voie orale aux doses de  $1250 \text{ mg.kg}^{-1}$  d'extraits solubilisés dans l'eau également additionnée de tween 80. Par contre, l'équipe brésilienne<sup>43</sup> qui a testé 148 espèces de plantes utilisées traditionnellement contre la fièvre l'a fait à la dose maximale de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Cette concentration nous apparaît insuffisante compte tenu de l'activité de la quinine sur *P. berghei* infectant la souris avec une DE50 de  $38 \text{ mg.kg}^{-1}$  et de sa concentration de quelques pour cent dans les extraits totaux d'écorces de quinquina. Dans notre travail, des concentrations maximales de  $1 \text{ g.kg}^{-1}$  ont été choisies pour mettre en évidence l'activité de principes actifs peu concentrés dans les plantes en fonction des limites techniques liées aux choix du modèle et des solvants.

### 2.2.1.3. choix des solvant d'extraction et de tests

L'éthanol à 70°C est utilisé à la fois dans l'extraction des principes actifs et dans les tests biologiques.

L'absence de toute toxicité de l'éthanol et du diméthyl-sulfoxyde (D.M.S.O.) *in vitro* à la concentration de 0,1% atteinte aux doses essayées, a été montrée dans les contrôles effectués pour chaque série de tests.

Ils sont utilisés en injections sous-cutanées *in vivo*. La dose maximale de solvant injectable à une souris de 20 g ± 2g est de 100 µl par jour pendant quatre jours en injections sous-cutanées pour les deux solvants. Cette quantité permet d'essayer les extraits de plantes sans trop de problèmes de solubilité jusqu'à 1000 mg.kg<sup>-1</sup>. Une dose supérieure de l'ordre de 10 g.kg<sup>-1</sup> a été testée en assurant la dispersion de l'extrait dans le solvant par un surfactant (tween 80) qui a montré par lui-même une certaine activité sur la parasitémie des souris.

Comme il a été vu précédemment, l'éthanol est avec l'eau, l'un des principaux solvants utilisés dans les préparations médicinales traditionnelles. Le caractère amphotère de l'éthanol et la solubilité des composés hydrophiles dans l'eau doit assurer une extraction maximale de toutes les classes de composés par l'éthanol à 70°C.

### 2.2.1.4. sélection des tests utilisables

Les tests *in vivo* sur la souris ont l'avantage de prendre en considération la métabolisation des principes actifs et leur disponibilité réelle sur le site d'action. Ici, la concentration du principe actif dans le sang de l'animal est mesurable dans la mesure où il s'agit d'un produit connu et détectable. Les tests pratiqués sur les principales classes d'antimalariques montrent la bonne sensibilité du test sur *P. berghei* infectant la souris.

Pour donner aux tests antipaludiques *in vitro* une plus grande sélectivité, Soto et coll.<sup>139</sup> ont proposé de les comparer à un test de cytotoxicité sur cellules de mammifères : le kératinocyte de cobaye. La comparaison des activités de la quinine a montré que le rapport entre son action antipaludique et sa cytotoxicité est de l'ordre de 1000 en faveur de l'activité antipaludique. Toutefois, ce procédé risque d'éliminer des extraits où l'activité est partagée entre différentes

molécules dont les unes peuvent être spécifiquement antipaludiques et les autres plus généralement cytotoxiques. Il devrait être donc utilisé plutôt pour confirmer l'activité spécifique de molécules isolées.

D'autres notions doivent être développées pour l'usage des tests dans des pays en voie de développement, à savoir les capacités scientifiques disponibles et le coût des techniques à mettre en œuvre. Dans la littérature disponible sur les essais de substances naturelles antipaludiques, la majorité des criblages, dix travaux sur les douze précédemment cités, se font à partir du test suppressif sur *Plasmodium* de souris. Cette technique est simple à mettre en place, ne demande aucune manipulation stérile et il n'y a pas d'utilisation de milieux synthétiques coûteux et difficiles à conserver. La coloration et la lecture des frottis sanguins sont à la portée d'un microscopiste moyen. La fourniture d'animaux est facile à réaliser en maintenant convenablement un élevage de rongeurs.

Cette facilité de mise en œuvre ne se retrouve pas dans les tests *in vitro*. La culture des parasites nécessite une bonne maîtrise de la culture cellulaire avec des réactifs et appareillages coûteux, l'automatisation demande la manipulation d'éléments radioactifs marqués. La préférence pour le test sur rongeur semble justifiée dans un pays où l'équipement et les compétences sont en adéquation avec les impératifs décrits ci-dessus.

### 2.2.2. Mise en évidence d'une activité antileishmanienne

L'unité de recherche ORSTOM à Cayenne (à partir des travaux de Fournet<sup>142</sup> sur une plante bolivienne présumée leishmanicide) a pour la première fois à notre connaissance exploré l'activité d'extraits de plantes présumées leishmanicides. Les conditions d'essai ont du être adaptées pour mettre en évidence l'activité de composés faiblement concentrés dans des extraits de plantes et dont les conditions de solubilisation sont inconnues. De plus comme on l'a vu plus haut, il n'existe pas un seul modèle expérimental suffisamment valable pour permettre une généralisation ou une transposition immédiate à l'homme de l'effet leishmanicide observé. La démarche employée ici aura été de suivre au plus près la pathologie locale et la façon traditionnelle de la soigner. Toutefois, cet effort méthodologique s'est accompli en plusieurs étapes du fait des difficultés rencontrées qui ont été de deux types :

\* difficultés spécifiques aux tests biologiques de substances naturelles et à l'interprétation que l'on peut en donner,

\* difficultés inhérentes à la transposition des tests d'un laboratoire à l'autre avec des équipements différents.

#### 2.2.2.1. In vitro

Deux tests *in vitro* ont été utilisés pour l'étude de l'activité antileishmanienne des extraits:

\* Un test d'inhibition de la culture des formes promastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis*; l'effet des extraits ajoutés à la culture en phase exponentielle, est recherché 48 heures après leur adjonction. La culture des promastigotes de *L. mexicana amazonensis* est assurée en continue sur milieu RPMI 1640 additionné de 10 % de sérum foetal de veau maintenu à 25 °C, avec réinoculation tous les quinze jours. Ce test comme on l'a vu précédemment, sur des formes du parasite éloignées des formes pathogènes n'a qu'une valeur indicative de cytotoxicité et il doit être accompagné par le test sur la forme amastigote des *Leishmania* infectant des macrophages.

\* Le modèle expérimental *Leishmania mexicana amazonensis* / macrophage de souris utilise l'infection *in vitro* de macrophages péritonéaux de souris par des amastigotes de *L.m. amazonensis*<sup>109</sup>. Des macrophages péritonéaux résidents sont obtenus par lavage de la cavité péritonéale de souris et infectés par des amastigotes de *L. m. amazonensis* provenant de granulomes de hamsters. Les produits à tester sont ajoutés et l'étude de leur activité appréciée par l'établissement des pourcentages de survie à 48 heures des organismes exposés aux composés.

Les deux espèces de *Leishmania* présentes en Guyane sont *L. braziliensis guyanensis* et *L. mexicana amazonensis*. Le choix s'est porté sur la seconde espèce pour deux raisons principales:

\* la facilité de mise culture de *L. m. amazonensis* qui se développe vite et se montre très infestante pour les hamsters alors que *L.b.guyanensis* se multiplie lentement et son pouvoir infestant sur les animaux de laboratoire est plus réduit<sup>143</sup>.

\* *L.b.guyanensis* donne en Guyane des infections cutanées qui guérissent spontanément après un an d'évolution alors que *L.m.amazonensis* donne à côté des formes cutanées classiques, des pathologies cutanées disséminées qui sont difficiles à soigner et qui semblent déborder les défenses immunitaires de l'hôte<sup>144</sup>. L'action leishmanicide de composés contre cette espèce pourrait avoir ainsi une portée plus grande.

La toxicité des produits est appréciée par le traitement au bleu trypan des macrophages exposés seuls aux produits.

La sensibilité du test aux antileishmaniens usuels sur la souche H142 a été évaluée par Guerrin (tableau N°1) dans le laboratoire du Dr Dedet à l'Institut Pasteur de Cayenne<sup>145</sup>.

Une dissociation nette des résultats des deux antileishmaniens de référence est notée dans les deux modèles expérimentaux :

\* la pentamidine ou Lomidine® se comporte comme un cytotoxique non spécifique aussi actif sur les promastigotes que sur les macrophages. Elle est active à des doses de l'ordre de 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ,

\* l'antimoniote de N-méthyl glucamine ou Glucantime® est très actif sur les amastigotes à l'intérieur des macrophages, sans toxicité pour les cellules hôtes avec une DE50 inférieure à 0,3  $\mu\text{g en Sb.ml}^{-1}$  mais pratiquement inactif sur les promastigotes. L'utilisation du seul test sur les promastigotes n'est donc pas prédictif pour ce genre de composés. Par contre, les composés qui montreraient une activité similaire à la pentamidine ne peuvent être rejetés du fait de la bonne activité de celle-ci en clinique humaine.

Composés de référence	modèles expérimentaux	1mg/ml	100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Antimoniote de N-méthyl glucamine	A Promastig. survivants %	1,8	61	78	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	0	0	0,3	19
		60	95	99	99
Méthane sulfonate de pentamidine	A Promastig. survivants %	0	0	4,5	70
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	-	-	-	99
		10	10	20	95

**Tableau N°1:** Activité des antileishmaniens usuels sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis in vitro* au laboratoire de Parasitologie de l'Institut Pasteur de Cayenne.

modèle A= promastigotes en culture,

modèle B = amastigotes infectant des macrophages de souris.

Dans le test effectué avec le même modèle amastigotes par nous-mêmes dans des conditions opératoires différentes décrites en détail dans le chapitre 5.2.2.2.1 de la partie expérimentale, sur une souche différente de *L.m.a.*(souche LV 79), la DE50 est de l'ordre de 50 µg en Sb.ml<sup>-1</sup> (tableau N° 2).

Composés de référence	modèles expérimentaux	600 µg/ml	300 µg/ml	150 µg/ml
Antimoniato de N-méthyl glucamine	Amastig. intracell. I.S.	0	3	68
Composés de référence	modèles expérimentaux	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
Antimoniato de N-méthyl glucamine	Amastig. intracell. I.S.	71	95	98

**Tableau N°2** : Activité du Glucantime®, antileishmanien usuel sur les modèles amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* infectant des macrophages de souris *in vitro* au laboratoire de Parasitologie de Chatenay-Malabry.

A cette discordance des résultats, on peut trouver une explication dans les faits expérimentaux suivants :

La méthode de séparation des amastigotes dans les deux méthodes est différente, dans la méthode dite "de Cayenne" qui a été utilisée dans la première partie du programme, les amastigotes sont séparés après broyage des tissus infectés et centrifugation des débris cellulaires, par pipetage de la couche intermédiaire solide les contenant. Dans la deuxième méthode indiquée par Rabinovitch, les amastigotes sont récupérés en suspension après une centrifugation à vitesse plus faible du broyat. L'avantage de la deuxième méthode réside dans la facilité de récupération d'amastigotes qui sont ainsi peu souillés par les débris cellulaires et donc plus facilement comptables au microscope à contraste de phase.

Neal et Croft<sup>146</sup> ont constaté sur le modèle *L. donovani* infectant le macrophage péritonéal de souris une différence d'activité des sels d'antimoine, fonction du ratio d'infection des

macrophages par les amastigotes : la DE50 des sels d'antimoine s'étale entre 1,5 et 20  $\mu\text{g}$  en  $\text{Sb} \cdot \text{ml}^{-1}$  suivant le nombre d'amastigotes par macrophage allant de 1 à 10. Berman et Lee<sup>147</sup> ont montré une différence de sensibilité entre des souches du complexe *mexicana* aux sels pentavalent d'antimoine avec une DE50 s'étalant entre 17 et 34  $\mu\text{g}$  en  $\text{Sb} \cdot \text{ml}^{-1}$  dans les mêmes conditions opératoires.

D'autre part, dans les expériences au laboratoire de parasitologie de Châtenay-Malabry, le comptage des amastigotes dans les macrophages juste après infection et dans les quarante-huit heures de la durée du test, a permis de constater que les amastigotes se multipliaient dans les macrophages. Cette multiplication doit se faire en fonction de la viabilité des macrophages qui peut être très différente suivant la manière dont a été conduite l'opération de récupération des macrophages. La stimulation et donc la mobilisation des macrophages péritonéaux peut être réalisée par injection de particules d'agar dans le péritoine des souris 48 heures avant la récolte des macrophages. Cela permet d'en récupérer plus, mais les macrophages inflammatoires activés par des lymphokines ont un équipement enzymatique plus destructeur que les macrophages dit résidents. Ils contiennent des métabolites réducteur de l'oxygène très microbicides<sup>148</sup>. L'infectibilité et le taux de multiplication des amastigotes dans les macrophages peuvent en être modifiés dans une proportion difficilement quantifiable. Neal et Croft<sup>146</sup> utilisent la méthode de stimulation par les particules d'agar sans en préciser les effets possibles alors que Rabinovitch et coll.<sup>109</sup> ont fait la comparaison entre macrophages élicités et résidents, dans la mesure de l'effet leishmanicide du méthosulfate de phénazine. Ils n'ont pas enregistré de différence entre les deux types de macrophages. Les expérimentations conduites à Cayenne ont été effectuées avec des macrophages résidents, les premières expériences conduites à Châtenay-Malabry l'ont été avec des macrophages stimulés pour augmenter la quantité de macrophage récoltés par souris et les dernières expérimentations, de nouveau, avec des macrophages résidents.

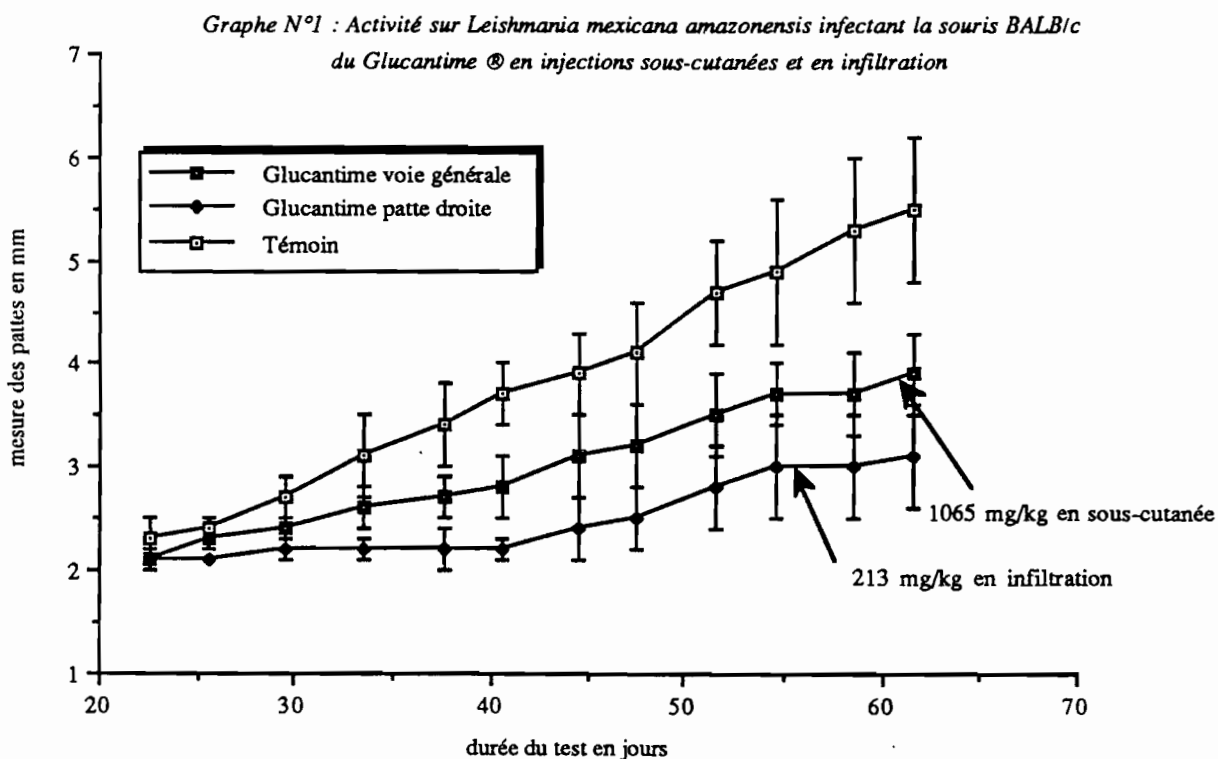
Toutefois, toutes les expériences ont été conduites avec des témoins "infections" et "solvants", ce qui permet d'avancer que dans un test donné, un composé ou un extrait a un effet mesuré. Mais la reproductibilité du test et la comparaison avec l'effet leishmanicide d'autres composés et fractions sont plus aléatoires. La difficulté de séparer et compter les amastigotes vivants et de

réussir une infection reproductible avec un taux constant d'amastigotes par macrophage posent une question méthodologique redoutable : ce test est-il adapté à la mise en évidence d'activité de principes actifs non définis et plus généralement à la mise en évidence de composés leishmanicides ? Deux remèdes pourraient être proposés pour ce problème de validation du modèle :

- \* l'usage des sels d'antimoine comme témoins positifs systématiques dans chaque expérience.
- \* le test de substances présumées leishmanicides sur des amastigotes libres issus de lésion, maintenus en vie dans un milieu adapté<sup>149</sup>.

#### 2.2.2.2. In vivo

L'essai d'activité est réalisé par infection de souris de lignées consanguines sensibles (Balb/c) par des amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* dans les pattes postérieures. On pratique de façon concomitante une injection sous-cutanée des composés actifs *in vitro* et cela pendant 5 jours. On observe pendant huit semaines consécutives l'accroissement des lésions cutanées des souris en mesurant une fois par semaine, l'épaississement des pattes postérieures. On rapporte les résultats à ceux des antileishmaniens usuels, ici les sels d'antimoine qui servent de témoins curatifs. L'utilisation de lignées de souris sensibles comme les BALB/c permet de mesurer l'effet du composé seul. Car ces souris ne semblent pas réagir immunologiquement à l'infection et meurent au bout d'une quinzaine de semaines si elles ne sont pas sacrifiées auparavant. Les médicaments efficaces chez l'homme ne font que ralentir le processus infectieux à des doses très importantes chez ces souris comme on peut le voir sur le graphe N°1 qui reporte l'activité du Glucantime en injections sous-cutanées et intralésionnelles. Ce test, utilisé tel quel pour les premiers essais, a été modifié ensuite pour se rapprocher le plus possible des conditions traditionnelles d'utilisation des drogues végétales et pour diminuer la quantité de principe actif à utiliser dans chaque expérimentation. L'extrait ou le principe actif isolé sont mis en contact avec l'animal infecté après quinze jours d'infection, la leishmaniose est franchement installée avec apparition du nodule caractéristique comme dans le cas du traitement traditionnel de la leishmaniose chez l'homme.



D'autre part, l'injection des produits se fait en une seule fois au niveau de la patte infectée par injection intralésionnelle, ce qui est comparable à l'application des extraits ou des poudres de plantes sur les lésions en médecine populaire. Cette manière de procéder économise du produit et permet une première constatation d'activité qui peut être confirmée par la suite par un traitement général. L'utilisation de topique en thérapie antileishmanienne est une chose courante pour les sels d'antimoine et fait l'objet de recherches cliniques pour des principes actifs en développement comme le kétoconazole<sup>150</sup>.

### 2.2.2.3. choix des solvant d'extraction et de tests

Le tableau N°3 montre dans une première approximation, qu'aux concentrations utiles pour dissoudre les extraits de plantes, les principaux solvants organiques sont trop toxiques pour les cellules utilisées dans les tests *in vitro*. La première phase du triage a donc utilisé l'eau à la fois comme solvant d'extraction à chaud des principes actifs des plantes et comme solvant de solubilisation de ces principes actifs pour les tester sur les cultures cellulaires. Au début des

essais, un procédé particulier de solubilisation dans l'eau qui augmente la solubilité des composés hydrosolubles au détriment des composés apolaires a été utilisé.

solvants testés	modèles expérimentaux	10 %	5 %	2 %	1 %	0,5 %
Ethanol absolu	A Promastig. survivants %	0	0	7,1	36,2	46,2
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	-	-	-	-	-
Diméthylsulfoxyde	A Promastig. survivants %	0	13	57	72	78
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	0	0	25	100	100
Glycérol	A Promastig. survivants %	0	1,7	31	61	68
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	34	54	66	67	68
Alcool iso-amylque	A Promastig. survivants %	0	0	0	0	0
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	0	0	0	0	0

**Tableau N°3** : Activité de différents solvants organiques sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis* *in vitro*

modèle A= promastigotes en culture,

modèle B= amastigotes infectant des macrophages de souris.

Il faut donc pour obtenir des résultats reproductibles, avoir une indication sur la solubilité des extraits. A cet effet, sont réalisés deux types d'essais de solubilité:

\*l'essai de solubilité simple:

Il permet d'obtenir la solubilité à la limite de la saturation. L'extrait dissous dans des tubes à essais par sonification est ensuite centrifugé. La lecture se fait par observation du fond des tubes à essais sur un papier quadrillé. On considère être au delà du maximum de solubilité lorsque le culot est suffisamment opaque pour cacher le quadrillage.

\*l'essai de solubilité "différentielle":

Il a pour but de concentrer au maximum les composés chimiques directement dans les milieux de culture utilisés dans les tests. Ces milieux étant de nature aqueuse, les substances polaires seront plus concentrées que les non-polaires, d'où l'appellation de "différentielle". L'extrait mis en contact avec le milieu par sonification à raison d'une concentration arbitraire de  $50 \text{ mg.ml}^{-1}$ , est ensuite centrifugé. Le surnageant est destiné en partie aux essais biologiques, l'autre partie permettant de déterminer sa concentration.

La dose maximale essayée est relativement importante soit  $2 \text{ mg.ml}^{-1}$  de milieu de culture compte tenu de la solubilité très médiocre dans l'eau des composés des plantes apolaires comme les terpènes. Des composés synthétisés, chimiquement définis, ont été testés à des concentrations de  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  de milieu de culture<sup>151</sup>. Dans cette publication, leur solubilisation est assurée directement par le milieu de culture, c'est à dire un tampon additionné de sérum foetal de veau. Si les molécules ne sont pas solubles dans le milieu, elles sont mises en suspension dans le milieu et stabilisées par addition d'un surfactant le tween 80. Toutefois, le tween 80 à 0,5 % a montré une forte activité inhibitrice dans un test sur *L. m. amazonensis* infectant le macrophage dans notre laboratoire (tableau N°4).

Composés de référence	modèles expérimentaux	1 %	0,5 %	0,1 %
Ethanol	Amastig. intracell.	105	160	237
	I.S.			
		10 %	5 %	1 %
NaOH N/10	Amastig. intracell.	178	215	201
	I.S.			
HCl N/10	Amastig. intracell.	137	212	182
	I.S.			
			0,5 %	
Tween 80	Amastig. intracell.	-	4	-
	I.S.			

**Tableau N°4** : essais de divers solvants sur le modèle amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* infectant des macrophages de souris *in vitro* au laboratoire de Parasitologie de Chatenay-Malabry.

Pour permettre l'essai des fractions et composés apolaires isolés par guidage biologique et comme l'activité doit augmenter avec la purification des principes actifs, des concentrations très faibles de diméthylsulfoxyde ont été testées sur les modèles *in vitro* et donnent des résultats acceptables pour le modèle amastigote à des concentrations inférieures ou égales à 0,1 % de DMSO dans le milieu (tableau N°5).

solvants testés	modèles expérimentaux	0,5 %	0,2 %	0,1 %	0,01 %
Diméthylsulfoxyde	A Promastig. survivants %	82	100	100	100
	B Amastig intracell. I.S.	61	76	97	100
	Macrophages survivants %	99	-	100	96

**Tableau N°5** : Activité du diméthylsulfoxyde à de plus faibles concentrations sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*  
 modèle A= promastigotes en culture,  
 modèle B= amastigotes infectant des macrophages de souris.

#### 2.2.2.4. sélection des tests utilisables

Dans la première phase du triage, la sélection des plantes a été faite à partir des résultats des tests *in vitro*, en fonction du type d'activité qui peut être soit cytotoxique en se comportant comme la pentamidine ou plus spécifiquement actifs sur les amastigotes infestant les macrophages comme les sels d'antimoine. On ne peut raisonnablement éliminer dans cette phase *in vitro* les extraits simplement cytotoxiques sans passer à côté de produits dont l'activité est comparable à celle de la pentamidine.

D'autre part, les extraits totaux de plantes actives *in vitro* auraient pu être testés directement *in vivo* en utilisant le procédé d'injection intralésionnelle sans procéder au préalable à l'extraction des principes actifs par guidage biologique *in vitro*. Ce test est plus sensible que le test par voie générale. L'essai des sels d'antimoine en injection intralésionnelle par rapport à l'injection sous-cutanée permet de diviser la dose active par cinq avec un effet curatif supérieur. On pourrait ainsi concentrer ces efforts sur les extraits réellement actifs *in vivo* et économiser ainsi des moyens. Les tests *in vivo* sont plus faciles à mettre en œuvre que les tests *in vitro* dans un laboratoire faiblement équipé pour les mêmes raisons que pour les essais antipaludiques. Toutefois, la durée plus longue des tests *in vivo* (environ huit semaines pour chaque série de tests) est un facteur limitant de son usage.

## **2.3. FRACTIONNEMENT DES PLANTES PAR GUIDAGE BIOLOGIQUE**

### **2.3.1. Critères de sélection des plantes**

Le premier critère de sélection des plantes de la flore guyanaise est évidemment l'action contre la leishmaniose et contre le principal symptôme du paludisme, la fièvre, qui leur est conférée en médecine traditionnelle par les populations locales .

#### 2.3.1.1. Critères bibliographiques

Une recherche bibliographique la plus complète possible doit être entreprise sur les espèces botaniques correctement identifiées durant la phase de criblage préliminaire. Elle indiquera soit l'absence de publications chimiques ou pharmacologiques pour l'espèce indiquée soit l'intérêt des publications sur des genres ou espèces voisines permettant d'envisager de trouver dans les taxons testés des composés chimiotaxonomiquement proches de composés connus à activités antiparasitaires ou cytotoxiques.

#### 2.3.1.2. Critères d'approvisionnement

A partir des résultats du triage préliminaire, un réapprovisionnement important de l'ordre du kg en poids sec des organes des plantes positives est nécessaire. Ici, intervient la disponibilité dans le milieu naturel de la plante qui fait éliminer les plantes rares ou de très petite taille. Il faut noter que de la sélection par les tests *in vitro* résulte un grand nombre d'extraits positifs, et ceci peut laisser l'équipe dans l'embarras pour choisir les plantes à travailler en priorité. Les critères de nouveauté phytochimique et d'abondance permettent de sélectionner les plantes pour l'isolement des principes actifs par guidage biologique.

### **2.3.2. Principe des fractionnements**

Pour la plupart des espèces récoltées, les divers organes de la plante sont séparés les uns des autres, desséchés séparément à une température ne dépassant pas 45°C et broyés finement. Sur les organes utilisés en médecine traditionnelle, on effectue des tests chimiques permettant de préciser les classes de composés présents dans les plantes : alcaloïdes, quinones, saponosides, stérols et triterpènes, cardénolides, iridoïdes, composés phénoliques dont les

tannins, les pigments flavoniques suivant la méthodologie reprise de Jacquemin et décrite dans Grenand et col.<sup>129</sup>. Les résultats de ces tests donnent une indication sur l'extraction possible d'une catégorie précise de composés qui peuvent être en toute hypothèse considérés comme responsables de l'activité de l'extrait total. Si aucun résultat significatif ne se dégage de ce test préliminaire, la méthodologie générale d'extraction est suivie (schéma N°4). Cette méthode est inspirée de celle préconisée par l'équipe de Philipson pour la recherche d'antipaludiques d'origine naturelle<sup>141</sup>. Les deux variantes par rapport à la méthode de Philipson sont :

- \* Le marc n'est pas repris par l'eau après épuisement par l'éther de pétrole et par le méthanol,
- \* la phase aqueuse résultante du partage chlorure de méthylène/eau est partagée de nouveau entre l'eau et le butanol, ce qui permet de séparer les composés très polaires comme les tannins des moins polaires comme la plupart des saponosides qui passent dans le butanol.

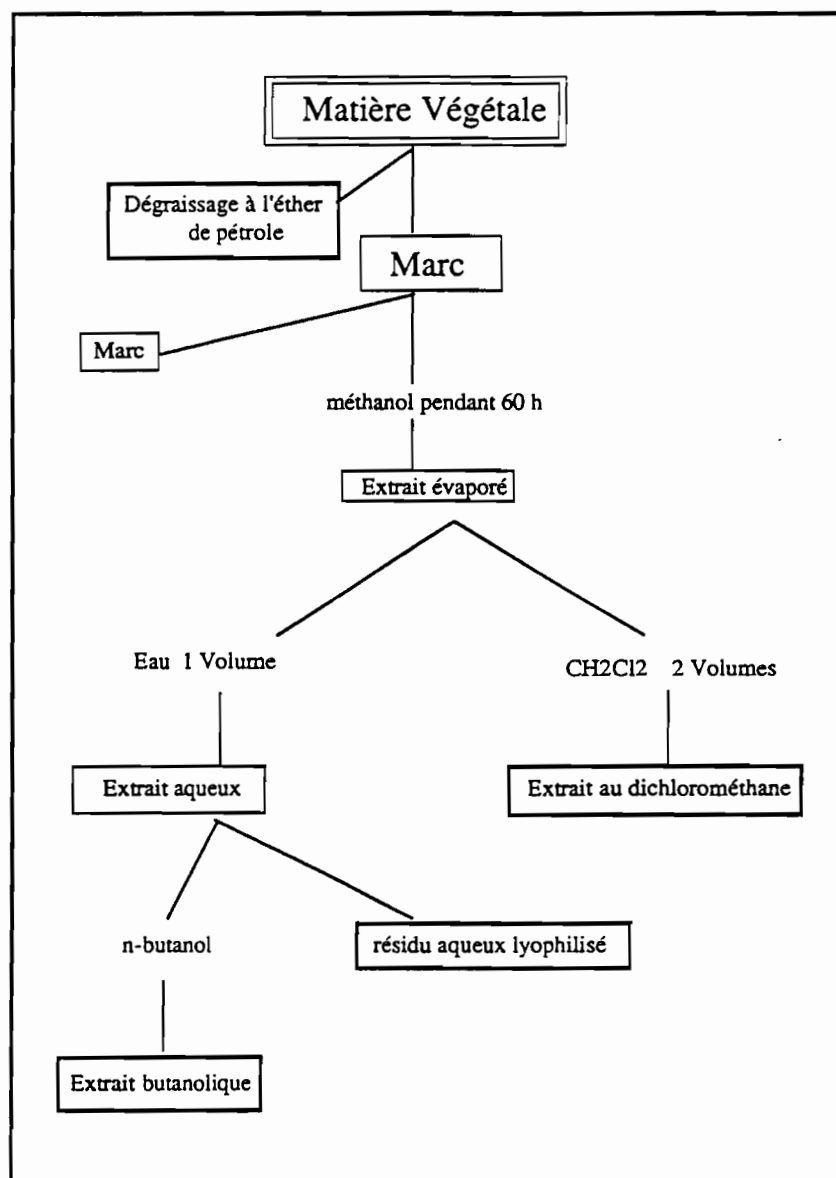


Schéma N°4 : Principe général d'extraction

Des chromatographies analytiques sur couches minces dans plusieurs mélanges de solvants de polarité croissante, sont faites systématiquement sur chaque fraction, avec révélation à l'acide chlorhydrique après chauffage. Elles permettent d'orienter le choix méthodologique (tests des fractions directement sur l'animal ou séparation des composés avant test) en fonction de la complexité du mélange des constituants. Les mélanges éluants suivants sont utilisés : chlorure de méthylène avec un pourcentage variable d'acétate d'éthyle pour séparer les composés apolaires, chlorure de méthylène avec un pourcentage variable de méthanol pour séparer les composés moyennement polaires et un mélange ternaire acétate d'éthyle, méthanol, eau, pour les composés polaires.

La séparation des constituants est faite à l'aide de chromatographies sur colonne avec des silices de granulométrie variable en colonnes ouvertes ou à basse pression suivant la méthode décrite par Still <sup>152</sup> et en chromatographie liquide haute pression à une pression de 10 bars. La purification des molécules est réalisée par des chromatographies sur couche épaisse de silice et des recristallisations dans différents solvants.

## **2.4. IDENTIFICATION DES PRINCIPES ACTIFS ET EXTENSIONS**

Les composés isolés dans ce type d'extraction par guidage biologique appartiennent à toutes les classes de composés possibles et sont la plupart du temps peu originaux. Ils sont identifiés par les méthodes usuelles de l'analyse structurale, spectrales en particulier.

### **2.4.1. Essais sur des analogues**

Il est souvent possible de compléter l'investigation en effectuant des tests sur des composés voisins pour vérifier s'ils possèdent une activité biologique plus intéressante. L'illustration de cette proposition sera faite dans la partie résultat de ce travail à travers deux exemples : les analogues de synthèse d'une benzoquinone naturelle et les analogues pharmacologiques d'inhibiteurs d'enzymes, les lignanes.

### **2.4.2. Pistes chimiotaxonomiques à suivre en fonction de la classe chimique du composé actif isolé**

Une activité intéressante sur une espèce d'une flore donnée doit être complétée par la recherche de cette activité dans les espèces du même genre. Souvent l'usage traditionnel réunit celles-ci dans une indication médicinale unique, ce qui peut se rapprocher de ce que l'on observe souvent en phytochimie où les espèces d'un même genre contiennent des composés très voisins. La bibliographie sur les plantes antiparasitaires peut aussi orienter un choix en cherchant des composés actifs au sein du genre, voire dans la même famille d'une espèce connue pour son activité parasiticide. Il a été ainsi recherché des dérivés de l'artémisinine dans une trentaine d'espèces d'*Artemisia* <sup>36</sup>.

## 2.5. CONFIRMATION D'ACTIVITE IN VIVO

La confirmation d'activité *in vivo* est tributaire de la quantité de principe actif isolé et c'est souvent le principal facteur limitant des recherches d'activité biologique de substances naturelles. Il est possible de pallier cette difficulté lorsque la molécule découverte n'est pas trop difficile à synthétiser. Cette approche a été retenue dans le cas d'une plante potentiellement leishmanicide, *Faramea guianensis* (Aublet), dont l'étude est présentée dans la troisième partie de ce travail. Les composés naturels actifs *in vitro*, n'étaient pas présents d'une façon permanente dans les différents lots de la plante après des réapprovisionnements sur d'autres sites.

Parfois l'activité s'est diluée du fait de la partition de plusieurs principes actifs situés dans des fractions de polarité différente.

La perte d'activité peut être due aussi à la fragilité des composés actifs isolés.

Pour ne pas alourdir la lecture des résultats des tests, les tableaux et graphes des plantes aux activités les moins significatives sont placés dans la partie expérimentale. Pour chaque tableau, schéma ou graphe placés dans la partie expérimentale, la page où ils se trouvent, est indiquée dans le texte.

### 3. RESULTATS OBTENUS

### 3.1. SUBSTANCES NATURELLES A ACTIVITE ANTIPALUDIQUE

#### 3.1.1. Inventaire des plantes fébrifuges de Guyane Française et du Surinam

Dans les pharmacopées des groupes amérindiens et créole de Guyane<sup>129</sup>, cent-quinze plantes fébrifuges ont été recensées (tableau N° 6). Dans l'étude encore en cours des pharmacopées des Noirs Marrons du Surinam, trente-neuf plantes fébrifuges sont recensées sous leurs noms vernaculaires (tableau N°7). Une partie des plantes récoltées ont été identifiées et seulement certaines d'entre elles ont fait l'objet de l'étude de leur activité antipaludique.

<i>Justicia pectoralis</i> N.J. Jacquin	ACANTHACEAE
<i>Pfaffia iresinoides</i> Sprengel	AMARANTHACEAE
<i>Furcraea faetida</i> Haw	AMARYLLIDACEAE
<i>Hymenocallis tubiflora</i> Salisbury	"
<i>Annona ambotay</i> Aublet	ANNONACEAE
<i>Annona haematantha</i> Miquel	"
<i>Guatteria discolor</i> R.E. Fries	"
<i>Unonopsis guatterioides</i> (A. de Candolle) R.E. Fries	"
<i>Xylopia frutescens</i> Aublet	"
<i>Xylopia longifolia</i> (Sagot) R.E. Fries	"
<i>Allamanda cathartica</i> Linnaeus	APOCYNACEAE
<i>Aspidosperma album</i> (Vahl) Benth	"
<i>Condylocarpon guianense</i> Desfontaines	"
<i>Geissospermum argenteum</i> Woodson	"
<i>Geissospermum laeve</i> (Vellozo) Miers	"
<i>Lacmellea aculeata</i> (Ducke) Monachino	"
<i>Mesechites trifida</i> (N.J. Jacquin) Mueller-Argoviensis	"
<i>Odontadenia cururu</i> (Martius) K. Schumann	"
<i>Odontadenia nitida</i> (Vahl) Mueller-Argoviensis	"
<i>Philodendron linnaei</i> Kunth	ARACEAE
<i>Aristolochia staheli</i> O.C. Schmidt	ARISTOLOCHIACEAE
<i>Aristolochia trilobata</i> Linnaeus	"
<i>Emilia sonchifolia</i> (Linnaeus) de Candolle	ASTERACEAE
<i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl	"
<i>Hebeclinium macrophyllum</i> (Linnaeus) de Candolle	"
<i>Mikania cordifolia</i> (Linnaeus f.) Willdenow	"
<i>Mikania guaco</i> Humboldt & Bonpland	"
<i>Mikania micrantha</i> Humboldt, Bonpland & Kunth	"
<i>Pluchea symphitifolia</i> (Miller) Gillis	"
<i>Rolandra fruticosa</i> (Linnaeus) O. Kuntze	"
<i>Wulffia baccata</i> (Linnaeus f.) O. Kuntze	"
<i>Arrabidaea candicans</i> (L.C. Richard) de Candolle	BIGNONIACEAE
<i>Macfadenya unguis-cati</i> (Linnaeus) A. Gentry	"
<i>Mansoa alliacea</i> (Lamarck) A. Gentry	"
<i>Schlegelia violacea</i> (Aublet) Grisebach	"
<i>Tabebuia capitata</i> (Bureau & K. Schumann) Sandwith	"
<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nicholson	"
<i>Ceiba pentandra</i> Gaertner	BOMBACACEAE
<i>Cereus</i> sp	CACTACEAE
<i>Cassia alata</i> Linnaeus	CAESALPINIACEAE
<i>Hymenaea courbaril</i> Linnaeus	"
<i>Combretum rotundifolium</i> Richard	COMBRETACEAE
<i>Momordica charantia</i> Linnaeus	CUCURBITACEAE
<i>Cyperus diffusus</i> Vahl	CYPERACEAE
<i>Cyperus haspan</i> Linnaeus	"
<i>Kyllinga odorata</i> Vahl	"
<i>Kyllinga pumila</i> Michaux	"
<i>Thamnomycetes rostratus</i> Mont.	DIATRYPACEAE
<i>Sloanea</i> sp	ELAEOCARPACEAE

<i>Euphorbia hirta</i> Linnaeus	EUPHORBIACEAE
<i>Phyllanthus amarus</i> Schumann & Thonning	"
<i>Phyllanthus caroliniensis</i> Walter	"
<i>Phyllanthus niruri</i> Linnaeus	"
<i>Phyllanthus urinaria</i> Linnaeus	"
<i>Plukenetia abutilifolia</i> (Ducke) Pax & Hoffmann	"
<i>Sapium ciliatum</i> Hemsley	"
<i>Coutoubea ramosa</i> Aublet	GENTIANACEAE
<i>Coutoubea spicata</i> Aublet	"
<i>Alloplectus coccineus</i> (Aublet) Martius ex G. Don	GESNERIACEAE
<i>Columnnea calotricha</i> J.D. Smith	"
<i>Drymonia campostyla</i> Leeuwenberg	"
<i>Episcia kohlerioides</i> Leeuwenberg	"
<i>Hyptis lanceolata</i> Poiteau	LAMIACEAE
<i>Ocimum micranthum</i> Willdenow	"
<i>Potalia amara</i> Aublet	LOGANIACEAE
<i>Psittacanthus</i> spp	LORANTHACEAE
<i>Lycopodium cernuum</i> Linnaeus	LYCOPODIACEAE
<i>Stigmaphyllon convolvulifolium</i> (Cavanilles) Adr. Jussieu	MALPIGHIACEAE
<i>Stigmaphyllon hypoleucum</i> Miquel	"
<i>Tetrapteryx discolor</i> (G.F.W. Meyer) de Candolle	"
<i>Hibiscus abelmoschus</i> Linnaeus	MALVACEAE
<i>Sida</i> spp	"
<i>Abuta barbata</i> Miers	MENISPERMACEAE
<i>Tinospora crispa</i> (Linnaeus) Miers	"
<i>Siparuna emarginata</i> Cowan	MONIMIACEAE
<i>Siparuna guianensis</i> Aublet	"
<i>Eugenia</i> sp nov.	MYRTACEAE
<i>Sauvagesia erecta</i> Linnaeus	OCHNACEAE
<i>Ludwigia hyssopifolia</i> (G. Don) Exell	ONAGRACEAE
<i>Catasetum barbatum</i> Lindley	ORCHIDACEAE
<i>Epidendrum paniculatum</i> Ruiz & Pavon	"
<i>Rodriguezia lanceolata</i> Ruiz & Pavon	"
<i>Alexa wachenheimi</i> R. Benoist	PAPILIONACEAE
<i>Dipteryx punctata</i> (Black) Amshoff	"
<i>Erythrina fusca</i> Loureiro	"
<i>Ormosia coutinhoi</i> Ducke	"
<i>Petiveria alliacea</i> Linnaeus	PHYTOLACCACEAE
<i>Peperomia</i> spp	PIPERACEAE
<i>Potomorphe peltata</i> Miq.	"
<i>Cympogon citratus</i> Linnaeus	POACEAE
<i>Pogostemon patchouli</i>	"
<i>Coutarea hexandra</i> K. Schumann	RUBIACEAE
<i>Faramea multiflora</i> A. Richard	"
<i>Manettia coccinea</i> (Aublet) Willdenow	"
<i>Psychotria ulviformis</i> Steyermark	"
<i>Fagara rhoifolia</i> (Lamarck) Engler	RUTACEAE
<i>Cupania hirsuta</i> Radlkofer	SAPINDACEAE
<i>Paullinia anodonta</i> Radlkofer	"
<i>Bacopa monniéri</i> (Linnaeus) Wettstein	SCROPHULARIACEAE
<i>Lindernia crustacea</i> Mueller-Argoviensis	"
<i>Scoparia dulcis</i> Linnaeus	"
<i>Selaginella</i> spp	SELAGINELLACEAE
<i>Picrolemma pseudocoffea</i> Ducke	SIMAROUBACEAE
<i>Quassia amara</i> Linnaeus	"
<i>Simaba cedron</i> Planchon	"
<i>Simaba moretii</i> Feuillet	"
<i>Simarouba amara</i> Aublet	"
<i>Smilax</i> spp	SMILACACEAE
<i>Cyphomandra endopogon</i> Bitter	SOLANACEAE
<i>Eryngium foetidum</i> Linnaeus	UMBELLIFERAE
<i>Urera caracasana</i> (N.J. Jacquin) Grisebach	URTICACEAE
<i>Citharexylum macrophyllum</i> Poiteau	VERBENACEAE
<i>Lantana camara</i> Linnaeus	"
<i>Renealmia guianensis</i> Maas	ZINGIBERACEAE
<i>Renealmia monosperma</i> Miquel	"

TABLEAU N°6 (suite) : PLANTES FEBRIFUGES DES "PHARMACOPEES TRADITIONNELLES EN GUYANE"

Tableau N°7 . Plantes fébrifuges des Noirs Marrons

N h MS	FAMILLE	Genre	Espèce	Nom vern S	Nom vern B	Nom vern D
57	Acanthaceae	<i>Justicia</i>	<i>pectoralis</i> N.J. Jacquin	vodu wi	tonewi	tone wi
113		<i>Justicia</i>	<i>pectoralis</i> N.J. Jacquin	papawi		tone wi
230	Annonaceae	<i>Annona</i>	<i>sericea</i> Dunal	pikisatokopepe		
363		<i>Duguetia</i>	<i>calycina</i> R. Benoist		ukutiki	
345			<i>sandwithii</i> R.E. Fries		ukutiki	
331			sp	pikisatokopepe	ukutiki	
70					ukutiki	
368			<i>spixiana</i> Martius		ukutiki	
162	Apiaceae	<i>Eryngium</i>	<i>foetidum</i> Linnaeus	mujekwentu		
510	Apocynaceae	<i>Bonafousia</i>	<i>undulata</i> (Vahl) de Candolle			mèliki tiki
486	Araceae	<i>Dieffenbachia</i>	sp			donkèn
357	Araliaceae	<i>Didymopanax</i>	<i>morotoni</i> (Aublet) Decaisne & Planchon	ataple	töbitutu	
621	Asteraceae	<i>Mikania</i>	sp		dontwa	
367		<i>Rolandra</i>	<i>fruticosa</i> (Linnaeus) O. Kuntze		mandjadjawi	
124	Bignoniaceae	<i>Mansoa</i>	<i>standleyi</i> (Steyermark) A. Gentry	ajuntètèj		
359		<i>Memora</i>	<i>flaviflora</i> (Miquel) Pulle		jènaticètèj	
43	Clusiaceae	<i>Vismia</i>	<i>guianensis</i> (Aublet) Choisy	bèbakapindiapao		
431	Lamiaceae	<i>Hyptis</i>	<i>lanceolata</i> Poiteau			konupuwi
352	Malpighiaceae	<i>Stigmaphyllon</i>	sp	djangafututataj	konkonikasaba	
511	Melastomataceae	<i>Leandra</i>	<i>pulverulenta</i> (de Candolle) Cogniaux			majowè
707		<i>Miconia</i>	sp	bitapumba		
200		<i>Miconia</i>	<i>holosericea</i> (Linnaeus) de Candolle	ditifèbe		
509	Mimosaceae	<i>Inga</i>	sp			miè
235				fejfifinga		
455		<i>Inga</i>	<i>paraensis</i> Ducke			weko
521			<i>splendens</i> Willdenow			niazi
135		<i>Newtonia</i>	<i>suaveolens</i> (Miquel) Brenan	pikinmisiki		
153		<i>Pithecellobium</i>	<i>glomeratum</i> (de Candolle) Benth	djabè		
149	Monimiaceae	<i>Siparuna</i>	<i>guianensis</i> Aublet	fèbepao	kapasitiki	
16				fèbepao		
596	Poaceae	<i>Guadua</i>	sp			tchan pè
552		<i>Ichnanthus</i>	<i>breviscrobs</i> Doell			pènpin
275	Pteridaceae	<i>Adiantum</i>	<i>glaucescens</i> Klotzsch	wakuwi		
340	Rubiaceae	<i>Borreria</i>	sp	pikibokopangi	djadjawi	
610						djadjawi
361	Rutaceae	<i>Monieria</i>	<i>trifolia</i> Linnaeus		mèsa	
406	Sapindaceae	<i>Paullinia</i>	<i>alata</i> (Ruiz & Pavon) G. Don			fèjfifinga
355	Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>asperum</i> L.C. Richard	asonitabaku	fòlosutiki	
322			<i>stramonifolium</i> N.J. Jacquin	matongamaka		
129				matongamaka		
354	Ulmaceae	<i>Trema</i>	<i>micrantha</i> (Linnaeus) Blume	pikutupao	misobosobi	
251				piikutupao		

### 3.1.2. Les bois de litières des singes écureuils (*Saimiri sciureus*)

A l'occasion des recherches sur un vaccin antipaludique produit à partir du modèle *Saimiri sciureus* infecté par *P. falciparum*<sup>23</sup>, l'équipe du laboratoire de Parasitologie de l'Institut Pasteur de Cayenne a constaté quelques faits expérimentaux<sup>153</sup> :

\* les parasitémies des singes après infection par les protozoaires montaient peu par rapport à ce qui était attendu malgré la splénectomie.

\* A la suite de ces observations, deux modifications dans les conditions d'élevage sont intervenues pour tenter de rétablir une montée normale de la parasitémie :

- la première a été de traiter les singes contre une infection bactérienne à *Klebsellia pneumoniae* qui était soupçonnée intervenir dans la multiplication érythrocytaire des *Plasmodium*. Après le traitement antibiotique, la parasitémie a monté normalement et parallèlement l'équipe de l'Institut Pasteur de Cayenne a isolé et identifié des cultures de *K. pneumoniae* une famille de toxines bactériennes polypeptidiques, les plasmocidines à forte activité antipaludique. Ces polypeptides agiraient par chélation du fer et ne sembleraient pas toxiques pour les mammifères hôtes. Ce travail a fait l'objet d'un brevet déposé par l'Institut Pasteur<sup>154</sup>.

- La seconde modification a concerné la litière des animaux, composée de bois de sciure provenant des scieries de bois précieux tropicaux provenant des forêts guyanaises qui a été remplacée par une litière synthétique. Ce changement de litière aurait permis également aux singes écureuils de retrouver une parasitémie normale.

Ces deux séries d'observation seraient indépendantes selon le Dr Dedet<sup>155</sup>.

Une enquête a été menée auprès des scieries pour déterminer les espèces d'arbres qui entrent dans la composition de la sciure livrée à l'Institut Pasteur. Ces arbres sont connus en Guyane sous leur noms commerciaux qui sont aussi les noms vernaculaires donnés par la population créole (tableau N° 8). Ces bois ont été récoltés de nouveau en forêt avec la constitution simultanée de collections d'herbier et l'extrait méthanolique de chaque tronc a été testé de nouveau (tableau N°9). Les extraits positifs aux tests antipaludiques *in vitro* ont fait l'objet d'une extraction suivant le schéma général décrit ci-dessus.

Nom vernaculaire	N° d'IDENTIF.	org.testé	% d'inhibition des cultures à 96 h plante	témoin solvant
Angélique	A.C. 190	B.T.	11.19	0.00
Bois violet	A.C. 187	B.T.	<b>95.00</b>	7.49
Cèdre	A.C. 188	B.T.	0.00	0.00
Goupi	A.C. 189	B.T.	4.58	0.00
Grignon franc	A.C. 193	B.T.	44.79	14.70
Saint Martin jaune	A.C. 194	B.T.	<b>99.86</b>	14.70
Saint Martin rouge	A.C. 191	B.T.	<b>85.69</b>	7.49
Wacapou	A.C. 195	B.T.	<b>96.50</b>	7.49
Wapa	A.C. 192	B.T.	0.00	0.00

Tableau N°8 : activité antipaludique *in vitro* des bois commerciaux constitutifs des litières des singes Saïmiri.

Nom vernaculaire	Correspondance avec les noms scientifiques	FAMILLE	N°herbier	% d'inhibition
Angélique	<i>Dicorynia guianensis</i> Amshoff	CAESALPINIACEAE	MS 740	11
Bois violet	<i>Peltogyne</i> spp	"	MS 810	-
Cèdre	<i>Ocotea</i> spp	LAURACEAE	MS 746	-
Goupi	<i>Goupia glabra</i> Aublet	CELASTRACEAE	JFL	-
Grignon franc	<i>Ocotea rubra</i> Mez	LAURACEAE	MS 742	-
Saint Martin jaune	<i>Hymenolobium flavum</i> Kleinhoonte	PAPILIONACEAE	MS 744	100
Saint Martin rouge	<i>Andira coriacea</i> Pulle	"	MS 741	100
	<i>Andira coriacea</i> Pulle	"	MS 811	-
	<i>Andira inermis</i> (Wright) Humboldt, Bonpland & Kunth	"	DS 2103	-
Wacapou	<i>Wacapoua americana</i>	"	MS 745	-
Wapa	<i>Eperua</i> spp	CAESALPINIACEAE	MS 743	0

Tableau N°9 : identification botanique et activité antipaludique *in vitro* des bois commerciaux constitutifs des bois de litière des singes Saïmiri.

### 3.1.3. Triage *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* : sélection des plantes à étudier

Les plantes issues des médecines traditionnelles les plus accessibles ont été récoltées pour subir les tests. Quelques unes d'entre elles ( HJ et AF) ont été ramassées antérieurement par des collègues phytochimistes de l'ORSTOM. Les drogues végétales sont conservées dans de bonnes conditions dans la salle à humidité contrôlée de l'ORSTOM de Cayenne. Des percolations des plantes sont faites sur 50 g de l'organe broyé utilisé en médecine traditionnelle. La drogue végétale est mise à macérer pendant 24 heures dans l'éthanol à 70°C et épuisée ensuite jusqu'à disparition de toute coloration. L'éthanol est distillé sous pression réduite et la solution aqueuse restante est lyophilisée. La conservation des extraits secs en Guyane se fait à - 20 °C à l'abri de la lumière pour éviter les décompositions des principes actifs. Les extraits secs sont ensuite remis en solution dans l'éthanol à 70°C pour subir les tests antipaludiques *in vitro*. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la parasitémie des extraits éthanoliques par rapport au pourcentage d'inhibition de la parasitémie du solvant. Dans le tableau N° 10 figurent les résultats de l'activité antipaludique sur *P. falciparum in vitro* des extraits éthanoliques des plantes sélectionnées. Cent-dix-neuf extraits représentant cent-quatre espèces ont ainsi été testés. Quarante-neuf extraits représentant quarante-trois espèces ont une activité inhibitrice de la parasitémie supérieure à 70% et ont été retenus pour des études ultérieures. Les familles des ANNONACEAE et des MENISPERMACEAE montrent une homogénéité d'activité qui peut être imputable en toute hypothèse à la présence d'alcaloïdes dans la plupart des espèces de ces familles.

FAMILLE	Espèce	N° d'herbier	organe testés	% d'inhibition d'cultures à 96 h	
				Plante	témoin solv.
AMARANTHACEAE	<i>Pfaffia glauca</i> (Martius) Sprengel	JFK 61	P.E.	8.20	18.03
AMARYLLIDACEAE	<i>Furcraea foetida</i> (Linnaeus) Haworth	MS 315bis	F.	12.42	11.62
"	<i>Crinum erubescens</i> W. Aiton	JFK 60	Bu.	68.55	0.00
"	<i>Hymenocallis tubiflora</i> Salibs	MS 561	F.	93.75	21.00
ANNONACEAE	<i>Dugetia sandwithii</i> R.E. Fries	MS 345	F.	99.27	13.86
"	<i>Dugetia sandwithii</i> R.E. Fries	MS 345	E.T.	100.00	4.85
"	<i>Dugetia</i> sp	MS 331	E.T.	99.35	1.29
"	<i>Dugetia</i> sp	MS 331	F.	92.23	1.29
"	<i>Dugetia eximia</i> Diels	MS 123	F.	100.00	4.52
"	<i>Dugetia eximia</i> Diels	MS 123	E.T.	100.00	20.71
"	<i>Dugetia calycina</i> R. Benoist	MS 363	E.T.	100.00	6.80
"	<i>Guatteria</i> sp	JJDG 7672	E.T.	100.00	6.80
"	<i>Anaxagorea</i> sp	JJDG 7680	E.T.	100.00	6.80
"	<i>Rollinia excusa</i> (Dun) A.D.C.	JJDG 7828	E.T.	22.41	5.74
"	<i>Guatteria scandens</i> Ducke	JJDG 8089	F.	7.12	9.55
"	<i>Dugetia friesii</i> Jansen-Jacobs	JJDG 6301	F.	99.78	0.00
"	<i>Annona muricata</i> Linnaeus	JFK 119	F.	25.27	0.00
"	<i>Guatteria discolor</i> R.E. Fries	HJ 2325	E.T.	99.42	0.00
"	<i>Guatteria</i> sp	JJDG 6472	F.	98.28	0.00
"	<i>Unonopsis guatterioides</i> (A. de Cand.) R.E. Fries	HJ 1890	E.T.	11.17	0.00
"	<i>Guatteria ouregou</i> (Aublet) Dunal	JFK 65	E.T.	96.67	14.70
"	<i>Unonopsis stipitata</i> Diels	JJDG 5837	P.A.	100.00	14.70
APOCYNACEAE	<i>Lacmelea aculeata</i> (Ducke) Monachino	JJDG 7473	E.T.	29.11	9.55
"	<i>Mesechites trifida</i> (N.J.J.) Mueller Arg.	HJ 1725	F.	28.51	5.59
"	<i>Allamanda cathartica</i> Linnaeus	JFK 100	E.T.	8.20	0.00
"	<i>Bonafousia undulata</i> (Vahl) de Candolle	MS 205	E.T.	85.75	0.91
"	<i>Condylocarpon guianensis</i> Desfontaines	M.F.P. 514	F.	24.71	5.74
"	<i>Condylocarpon guianensis</i> Desfontaines	M.F.P. 514	T.	44.82	5.74
"	<i>Odontadenia puncticulosa</i> (A. Richard) Pulle	JFK 145	F.	0.00	
"	<i>Himathanthus cf articulatus</i> (Vahl) Woodson	JFK 147	F.	0.00	
"	<i>Himathanthus cf articulatus</i> (Vahl) Woodson	JFK 147	T.	0.00	
ARISTOLOCHIACEAE	<i>Aristolochia staheli</i> O.C. Schmidt	CM 1147	T.	87.73	7.56
"	<i>Aristolochia</i> sp	MS 210	T.	26.12	20.70
ASTERACEAE	<i>Mikania cf guaco</i> H. et B.	HJ 2212	F.	33.62	4.52
"	<i>Mikania cf guaco</i> H. et B.	HJ 2212	T.	13.36	4.52
"	non identifié	MS 351	P.A.	7.60	4.85
"	<i>Rollandra fructifera</i> (L.) O. Kuntze	JFK 19	P.E.	26.23	18.03
"	<i>Wulfia bacata</i> (L.) O. Kuntze	JFK 71	P.E.	12.62	1.66
"	<i>Emilia sonchifolia</i> (L.) de Candolle	JFK 79	P.E.	18.81	1.66
"	<i>Ayapana triplinervis</i> (Vahl) King et Robinson	JFK 80	P.E.	0.71	1.66
"	<i>Mikania micrantha</i> H.B.K.	HJ 1609	P.A.	16.51	5.59
"	<i>Mikania cordifolia</i> (L.) Willdenow	HJ 1430	P.A.	6.62	0.00
BIGNONIACEAE	<i>Memora flaviflora</i> (Miq) Pulle	MS 359	T.	98.40	6.80
"	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A. Gentry	P et G 1976	F.	52.87	5.74
"	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A. Gentry	P et G 1976	T.+R.	75.86	5.74
"	<i>Macfadenya uncata</i> (H.C.A.) Sprayer et Sanduir	JFK 75	P.E.	53.11	18.03
"	<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nich.	HJ 1461	T.	6.62	0.00
"	<i>Mansoa</i> sp	MS 731	T.	0.00	0.00
"	<i>Mikania</i> sp	MS 716	P.E.	91.31	5.63
"	<i>Macfadenya unguiscati</i> (L.) A. Gentry	MS 749	P.E.	5.00	0.00
BOMBACACEAE	<i>Ceiba pentandra</i> Gaertner	AC 185	E.T.	0.00	0.00
CANNACEAE	<i>Cana indica</i> Lianneus	JFK 84	P.E.	6.69	0.00
CLUSIACEAE	<i>Vismia cayennensis</i> (NJJ) Persoon	JFK 125	E.T.	26.27	0.00
CUCURBITACEAE	<i>Momordica charantia</i> Linnaeus	JFK 104	P.A.	9.69	0.00

Tableau N°10 : Résultats de l'activité anti-paludique sur *Plasmodium faciparum* in vitro des extraits éthanoliques de plantes sélectionnées .

FAMILLE	Espèce	N° d'herbier	organe testés	% d'inhibition des cultures à 96 h	
				Plante	témoin solv.
CAESALPINIACEAE	<i>Senna alata</i> (L.) Roxburg	JFK 83	F.	45.35	18.03
CAPRIFOLIACEAE	<i>Sambucus simpsoni</i> Rheder	JFK 76	F.	16.66	18.03
ELAEOCARPACEAE	<i>Sloanea</i> sp	DS 1234	E.T.	91.00	
EUPHORBIACEAE	<i>Sapium ciliatum</i> Hemsley	P et G 1964	F.	100.00	5.74
"	<i>Sapium ciliatum</i> Hemsley	P et G 1964	T.+R.	51.14	5.74
"	<i>Phyllanthus amarus</i> Schumann et Thonning	JFK 77	P.E.	98.33	1.66
"	<i>Euphorbia hirta</i> Linnaeus	JFK 9	P.E.	45.12	21.00
"	<i>Sapium klotzchianum</i> (M.A.) Huber	MS 644	B.T.	30.02	0.00
"	<i>Sapium klotzchianum</i> (M.A.) Huber	MS 644	E.T.	51.74	0.00
"	<i>Sapium klotzchianum</i> (M.A.) Huber	MS 644	F.	99.19	0.00
"	<i>Plukenetia abutaefolia</i> (Ducke) Pax et Hoff	AC 197	E.T.	59.07	7.49
"	<i>Phyllanthus caroliniensis</i> Walter	CF 4206	P.E.	33.00	0.00
GENTIANACEAE	<i>Coutoubea racemosa</i> Aublet	MS 381	P.A.	21.84	5.74
"	<i>Coutoubea spicata</i> Aublet	MS 649	P.E.	19.30	0.00
"	<i>Tachia guianensis</i> Aublet	M 18002	P.A.	45.00	
LAMIACEAE	<i>Hyptis mutabilis</i> (Richard) Briquet	JFK 115	P.A.	98.00	
LOGANIACEAE	<i>Potalia amara</i> Aublet	JFK 6	F.	22.89	5.74
"	<i>Potalia amara</i> Aublet	JFK 6	T.	20.68	5.74
LYCOPODIACEAE	<i>Lycopodium cernuum</i> Linnaeus	JFK 68	P.E.	81.90	1.66
MALVACEAE	<i>Sida acuta</i> Burman	JFK 66	P.E.	7.99	0.00
"	non identifié	JFK 117	R.	6.59	0.00
MALPIGHIACEAE	<i>Stimaphyllon</i> sp	MS 352	P.A.	13.20	6.80
MELASTOMACEAE	<i>Clidemia hirta</i> var. <i>elegans</i> (Aub.) Griseb	JFK 70	F.	99.04	5.59
"	<i>Miconia holosericea</i> (L.) D.C.	MS 200	F.	0.00	20.71
MENISPERMACEAE	<i>Tinospora crispa</i> (L.) Miers	MS 326	T.	2.98	20.71
"	<i>Abuta barbata</i> Miers	HJ 2340	T.	99.72	5.59
"	<i>Abuta barbata</i> Miers	AF 19	T.	100.00	0.00
"	<i>Abuta barbata</i> Miers	AF 70	T.	100.00	0.00
"	<i>Abuta bullata</i> Moldenke	AF 66	F.	100.00	0.00
"	<i>Abuta bullata</i> Moldenke	AF 66	T.	100.00	0.00
"	<i>Abuta bullata</i> Moldenke	AF 66	R.	100.00	0.00
"	<i>Abuta solimoensis</i> Kruk et Bern	AF 61	T.	98.82	5.63
MIMOSOIDAE	non identifié	AC 166	E.T.	0.43	4.52
MONIMIACEAE	<i>Siparuna guianensis</i> Aublet	MS 149	F.	17.24	4.52
"	<i>Siparuna emarginata</i> Cowan	M 18010	E.T.	56.24	7.49
"	<i>Siparuna emarginata</i> Cowan	M 18010	F.	100.00	0.00
MYRTACEAE	<i>Eugenia</i> sp nov	P et G 1971	F.	93.60	5.74
"	<i>Eugenia</i> sp nov	P et G 1971	T.+R.	99.42	5.74
OCHNACEAE	<i>Sauvagesia erecta</i> Linnaeus	MS 753	P.A.	63.00	0.00
ONAGRACEAE	<i>Ludwigia hyssopifolia</i> (G.Don) Exell	JFK 72	P.E.	99.28	1.66
PAPILLONACEAE	<i>Tephrosia sinapou</i> (Buc'hoz) A. Chev.	MS 313	R.	82.10	20.71
"	<i>Mucuna urens</i> (L.) de Candolle	JFK 103	Gr.	2.13	0.00
PIPERACEAE	<i>Peperomia obtusifolia</i> (L.) A. Dietrich	JJDG 7690	P.E.	99.99	9.55
"	<i>Peperomia</i> sp	JJDG 7689	P.E.	96.02	9.55
"	<i>Peperomia macrostachya</i> (Vahl) A. Dietrich	JFK 69	P.E.	10.09	5.59
"	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) H.B.K.	JFK 4	P.E.	42.50	21.00
"	<i>Peperomia angustata</i> H.B.K.	JFK 3	P.E.	49.25	21.00
"	<i>Peperomia rotundifolia</i> (L.) H.B.K.	JFK 4	P.E.	70.25	21.00
PHYTOLOCACEAE	<i>Petiveria alliacea</i> Linnaeus	JFK 92	P.E.	13.37	5.59
PONTEDERIACEAE	<i>Eichornia crassipes</i> (Martius) Solms	JFK 132	P.E.	97.34	0.00

Tableau N°10 (suite) : Résultats de l'activité anti-paludique sur *Plasmodium falciparum* in vitro des extraits éthanoliques de plantes sélectionnées .

FAMILLE	Espèce	N° d'herbier	organe testé	% d'inhibition des cultures à 96h	
				Plante	témoin solvant
RUBIACEAE	non identifié	MS 329	F.	61.90	1.29
"	<i>Sipanea pratensis</i> Aublet var. <i>pratensis</i>	JFK 106	P.E.	94.27	0.00
"	<i>Psychotria urviformis</i> Steyermark	MS 648	P.E.	8.00	0.00
RUTACEAE	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christ.) Swingle	JFK 101	F.	8.98	
"	<i>Fagara pentandra</i> Aublet	MS 647	E.T.	23.32	0.00
"	<i>Fagara rhoifolia</i> (Lamarck) Engler	MS 645	E.T.	86.15	5.63
SIMARUBACEAE	<i>Quassia amara</i> Linnaeus	JFK 118	R.	97.95	0.00
SMILACACEAE	<i>Smilax</i> sp	MS 751	F.	4.00	0.00
SOLANACEAE	<i>Solanum surinamensis</i> Steudel	MS 750	F.	95.00	0.00
ULMACEAE	<i>Trema micrantha</i> (L.) Blume	MS 354	T.	58.00	6.80
UMBELLIFERAE	<i>Eryngium foetidum</i> Linnaeus	MS 325	P.A.	25.37	20.71
VERBENACEAE	<i>Lantana camara</i> Linnaeus	JFK 67	F.	86.88	18.03
"	<i>Stachytarpheta cayennensis</i> Vahl	MS 748	P.E.	0.00	0.00
ZINGIBERACEAE	<i>Renealmia guianensis</i> Maas	MS 21	Rh.	21.00	7.56

Signification des codes : Organes testés : F.= feuille; T.= tige; R.= racine; Rh.= rhizome; P.A.= partie aérienne; P.E.= plante entière; E.T.= écorce de tige.

Noms des récolteurs : JFK=Jean-François Kodjoed; MS=Michel Sauvain; JJDG=Jean-Jacques de Granville; HJ=Henri Jacquemin; MFP=Marie-Françoise Prévost; CM = Christian Moretti; P et G=Prévost et Grenand; DS= Daniel Sabatier; CF=Christian Feuillet; M= Scott Mori; AF=Alain Fournet; AC=pas de collection, analyse chimique.

Tableau N°10 (fin) : Résultats de l'activité anti-paludique sur *Plasmodium faciparum in vitro* des extraits éthanoliques de plantes sélectionnées .

### 3.1.4. Fractionnement par guidage biologique des plantes sélectionnées

#### 3.1.4.1. Fractionnements suivant le schéma général

L'extraction par fractionnement (voir schéma N°4, p77) a été appliquée aux plantes antipaludiques pour lesquelles un réapprovisionnement en quantité suffisante a été possible (tableau N° 11) et qui ne contiennent pas d'alcaloïdes : *Andira coriacea*, *Wacapoua americana*, *Hymenolobium flavum* , *Peltogyne* sp, *Andira inermis*, *Sapium ciliatum*, *S. klotzchianum*, *Eugenia* sp nov, *Ludwigia hyssopifolia*, *Eichornia crassipes*, *Sipanea pratensis*, *Eucalyptus cf urophila*.

Trois des cinq drogues issues des bois de sciage, positives lors des essais biologiques préliminaires ont été extraites suivant le protocole général. L'activité *in vitro* est concentrée dans les fractions apolaires (éther de pétrole et chlorure de méthylène) des drogues pour les

Espèce	Famille	N° d'herbier	organe	quantité de drogue	éther de pétrole	dichlorométhane	"insoluble"	butanolique	aqueuse
<i>Sapium ciliatum</i>	Euphorbiaceae	PG 1964	Feuilles	100 g	-	2,45 g	0,78 g	3,04 g	5,34 g
<i>Sapium cf klotzchianum</i>	"	MS 644	Feuilles	400 g	22,35 g	6,27 g	2,79 g	22,35 g	9 g
<i>Phyllanthus amarus</i>	"	JFK 77	Plante entière						
<i>Eugenia sp nov</i>	Myrtaceae	P et G 1971	Tiges	300 g	-	0,72 g	9,92 g	8,88 g	-
"	"	"	Feuilles	100 g	2,04 g	4,14 g	-	3,42 g	4,87 g
<i>Ludwigia hyssopifolia</i>	Onagraceae	JFK 72	Plante entière	200 g	2,16 g	3,50 g	0,47 g	13,14 g	5,82 g
<i>Andira coriacea</i>	Papilionaceae	MS 741	Bois de tronc	350 g	18,66 g	4,59 g	-	7,37 g	4,99 g
<i>Hymenolobium flavum</i>	Papilionaceae	MS 744	Bois de tronc	350 g	0,61 g	3,65	12,42 g	3,54 g	1,52 g
<i>Eichornia crassipes</i>	Pontederiaceae	JFK 132	Plante entière	530 g	2,95 g	4,63 g	3,88 g	5,47 g	14,63 g
<i>Sipanea pratensis</i>	Rubiaceae	JFK 106	Plante entière	800 g	13,55 g	5,35 g	92,18 g	14,38 g	10,55 g

**Tableau N°11** : Identification et poids des fractions ayant fait l'objet d'une étude d'activité antipaludique par guidage biologique

quatre arbres sélectionnés (tableau N° 12). Sur une petite quantité (70 mg) de ces fractions, une chromatographie préparative a été effectuée. L'activité antipaludique *in vitro* a été recherchée sur les fractions obtenues.

L'extrait au dichlorométhane d'*Andira coriacea* présente l'activité la plus intéressante (tableau N° 13) et montre en chromatographie analytique sur couche mince une composition simple.

Cette espèce a donc été sélectionnée pour la séparation de ces principes actifs.

Identification des espèces	% d'inhibition aux doses:100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml
<i>Andira coriacea</i> MS 741			
extrait à l'éther de pétrole	79	64	00
extrait au dichlorométhane	97	94	56
extrait "insoluble"	95	94	18
extrait butanolique	22	04	22
extrait aqueux	61	32	09
<i>Hymenolobium flavum</i> MS 744			
extrait à l'éther de pétrole	49	34	05
extrait au dichlorométhane	97	97	48
extrait "insoluble"	93	90	06
extrait butanolique	58	18	09
extrait aqueux	04	00	00
<i>Wacapoua americana</i> MS 745			
extrait à l'éther de pétrole	96	98	16
extrait au dichlorométhane	96	96	57
extrait butanolique	43	23	04
extrait aqueux	00	00	00

Tableau N°12 : Résultats de l'activité anti-paludique sur *Plasmodium falciparum in vitro* des fractions chromatographiques des bois de lièvre.

N° d'identification des espèces	% d'inhibition aux doses: 50 µg/ml	10 µg/ml	2 µg/ml
<i>(Andira coriacea MS 741)</i>			
extrait à l'éther de pétrole			
AC1A	55	23	8
AC1B	78	25	26
extrait au dichlorométhane			
AC2A	96	35	21
AC2B	99	51	22
AC2C	99	69	0
AC2D	99	59	16
<i>(Hymenolobium flavum MS 744)</i>			
extrait à l'éther de pétrole			
AS1A	74	3	0
AS1B	97	10	0
AS1C	88	19	16
AS1D	50	2	27
extrait au dichlorométhane			
AS2A	95	13	21
AS2B	99	23	14
AS2C	98	19	9
AS2D	98	18	14
AS2E	99	18	5
AS2F	99	42	7
<i>(Wacapoua americana MS 745)</i>			
extrait à l'éther de pétrole			
WA1A	99	49	22
WA1B	99	44	29
WA1C	99	45	30
extrait au dichlorométhane			
WA2A	97	28	26
WA2B	99	62	23
WA2C	99	46	27

Tableau N°13 : Résultats de l'activité anti-paludique sur *Plasmodium falciparum in vitro* des fractions chromatographiques des bois de lière.

#### 3.1.4.2. Extraction des alcaloïdes

Sept plantes ont fait l'objet d'une extraction des alcaloïdes totaux. Il s'agit de *Hymenocallis sp*, de *Duguetia calycina* R. Ben, de *Duguetia eximia* Diels, de *Guatteria sp*, d'*Annaxagorea sp*, de *Lycopodium cernum* et de *Siparuna emarginata*. Dans les deux premiers cas, l'activité anti-paludique *in vitro* a été mesurée et elle est due aux alcaloïdes totaux. Elle est effective à des concentrations respectivement de 0,5 et 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pour les quatre suivantes, l'activité a été recherchée directement *in vivo*. La quantité d'alcaloïdes totaux isolée de *Siparuna emarginata* est trop faible pour envisager des essais sur l'animal et le test *in vitro* n'est pas pratiqué dans le laboratoire de Châtenay-Malabry.

#### 3.1.4.3. Traitement des fractions actives

Après un test d'activité *in vitro*, et guidé par la séparation chromatographique des composés dans les différents mélanges éluants, les fractions actives ont été traitées de deux façons différentes en fonction de la complexité du contenu :

- 1/ un isolement des constituants des fractions positives : pour le paludisme, seuls ont été isolés les constituants de la fraction extraite au dichlorométhane d'*Andira coriacea*, testés ensuite *in vivo*.
- 2/ dans les autres cas, les fractions ont été testées directement sur l'animal.

#### 3.1.4.4. Principes actifs isolés d'*Andira coriacea*

La séparation des constituants de la fraction extraite au dichlorométhane d'*Andira coriacea*, a conduit à l'isolement de quatre polyphénols (schéma N°5, partie expérimentale p138) :

- 1/ des chromatographies successives et des cristallisations ont abouti à la purification d'un composé de poids moléculaire 284 déjà isolé par Pedreira Lapa Bautista et coll.<sup>156</sup> comme composant majoritaire des racines d'une autre espèce du même genre, *Andira humilis* Mart. ex Benth, la biochanine-A (45). C'est une isoflavone dont les caractéristiques spectrales sont en tout point semblables à celles du produit que nous avons isolé.

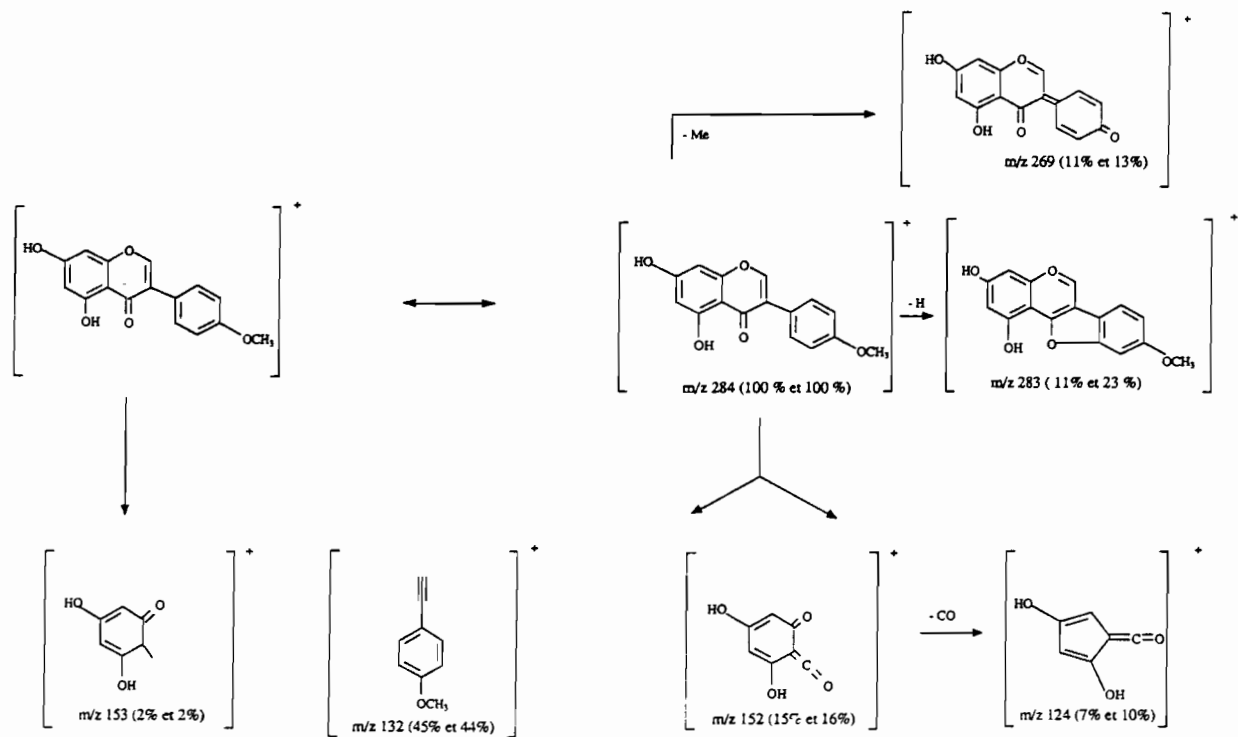
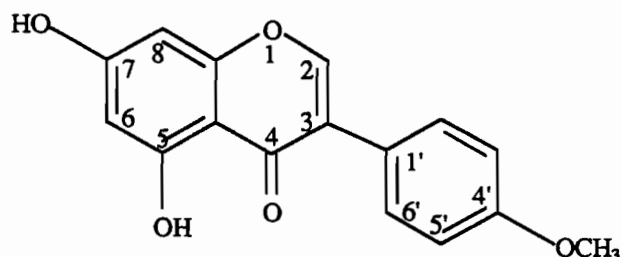


Schéma N°6 : Fragmentations en spectrométrie de masse par impact électronique de la Biochanine A



**45** Biochanine-A

Sur le schéma N°6 sont représentées les fragmentations en impact électronique proposées par Pedreira Lapa Bautista - les deux pourcentages indiqués entre parenthèses correspondent aux intensités des pics de fragmentations décrits par ces auteurs et obtenus avec le composé que nous avons isolé d'*Andira coriacea*. Ce composé a également été isolé antérieurement de *Andira parviflora* Ducke<sup>157</sup>.

2/ Le second composé présente dans son spectre de masse (IE) les fragments caractéristiques à  $m/z$  153 et  $m/z$  166 (schéma N°7) d'un noyau benzénique substitué.

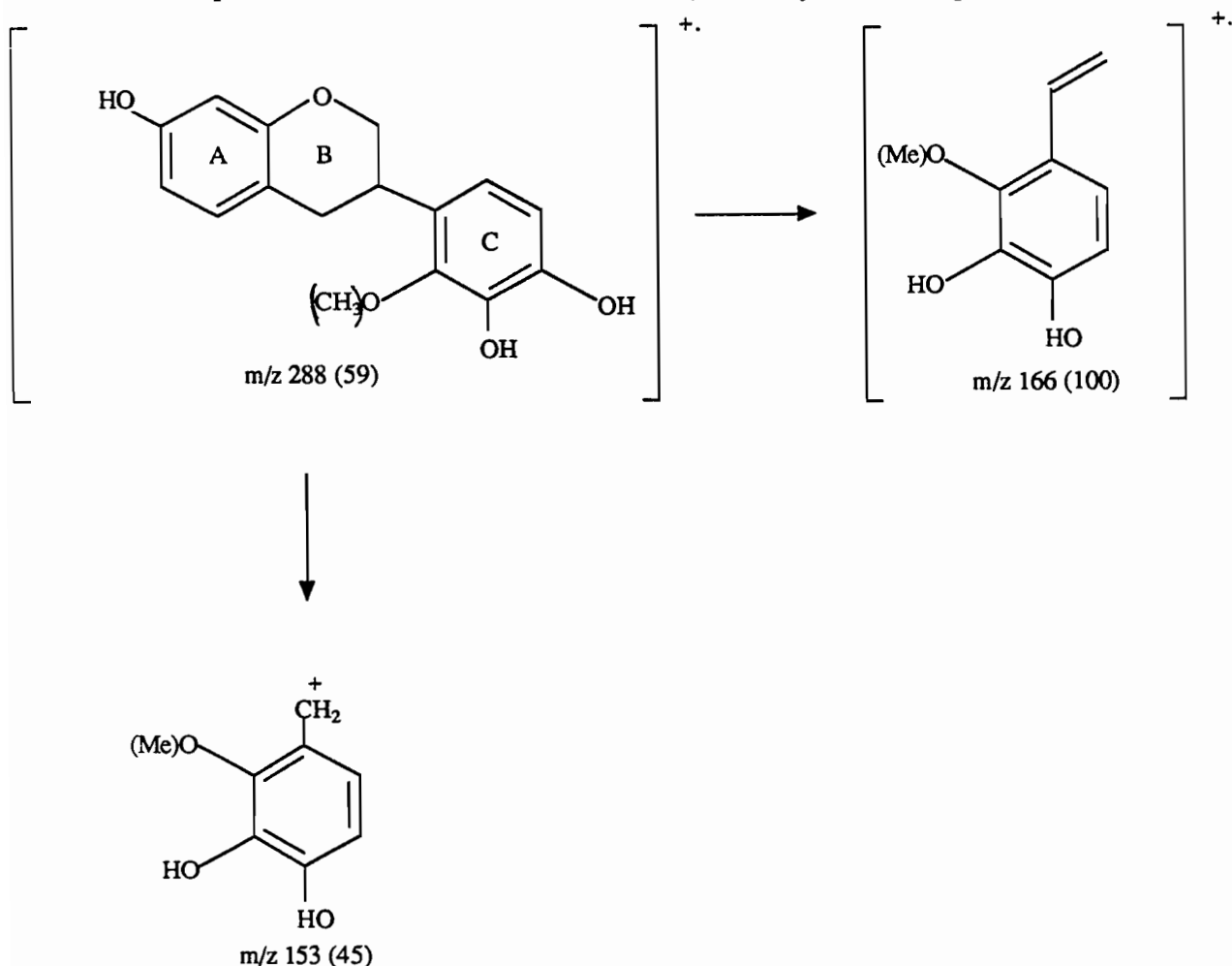


Schéma N°7 : Fragmentations caractéristiques du désméthyllaxiflorane

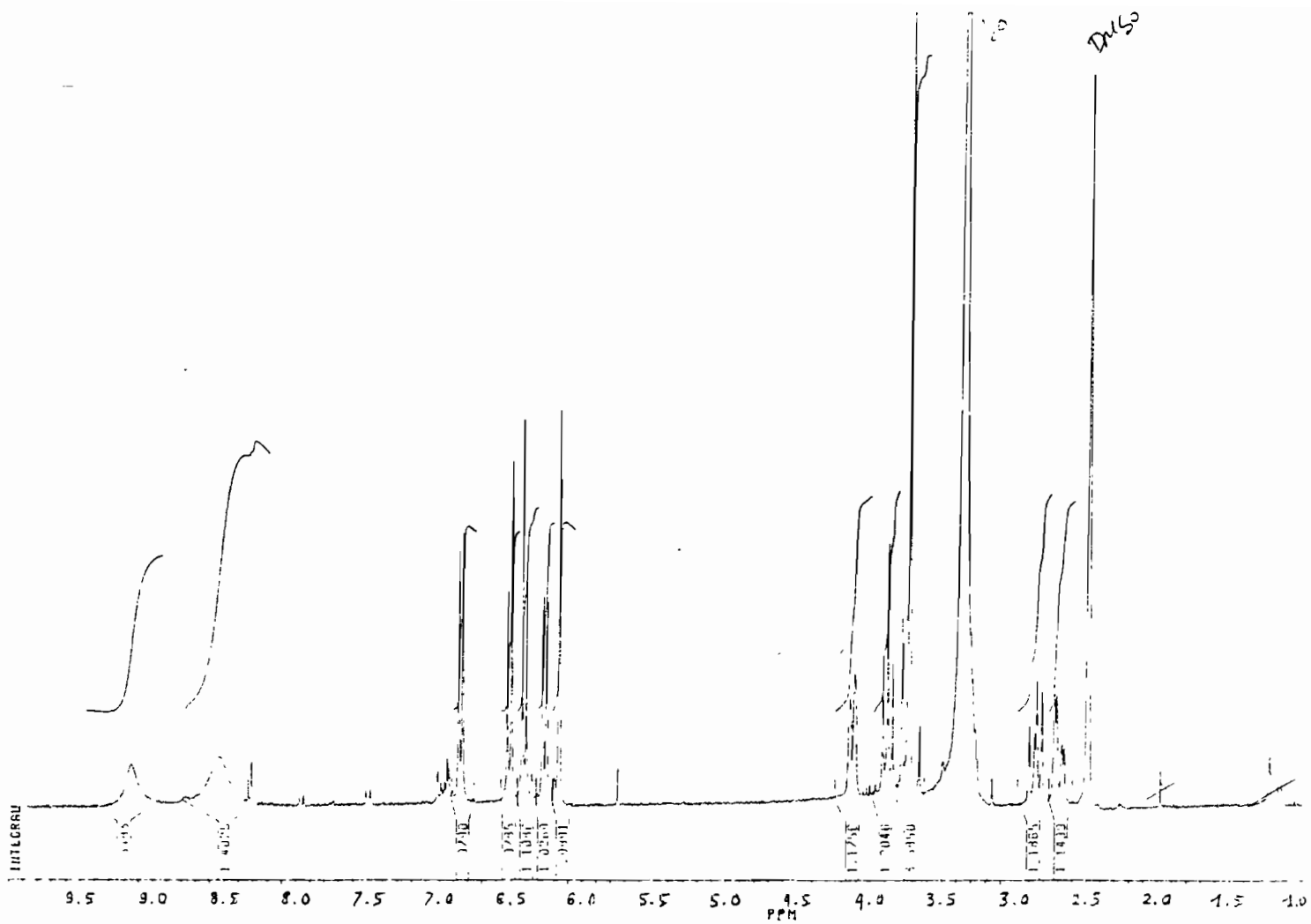
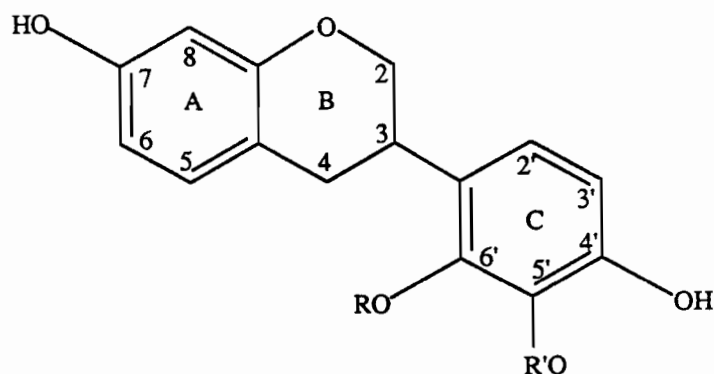


Figure N°4 : spectre de RMN  $^1\text{H}$  de 46 à 250 MHz dans le DMSO

Cette fragmentation permet de proposer pour ce composé une structure de type isoflavane qui a été confirmée par R.M.N.  $^1\text{H}$ .

En effet (figure N°4), on observe 5 protons aromatiques. Deux d'entre eux (6,50 ppm et 6,40 ppm) présentent une constante de couplage dont la valeur de 8,5 Hz indique leur position en *ortho* et précisent l'existence d'un noyau aromatique tétrasubstitué 1,2,3,4 dans le composé. Un doublet dédoublé centré à 6,26 ppm présente deux constantes de couplage 8 Hz et 2,5 Hz qui indiquent le voisinage *meta* de deux protons, l'un en *ortho* et l'autre *meta*. Ces protons résonnent respectivement à 6,85 ppm et à 6,16 ppm et se présentent sous forme de doublets  $J = 8 \text{ Hz}$  et  $J = 2,5 \text{ Hz}$  indiquant un noyau aromatique trisubstitué en *ortho* et *para*. Les déplacements chimiques et les couplages des protons à bas champ sont caractéristiques de l'enchaînement des isoflavanes non substitués sur l'hétérocycle B. Le laxiflorane isolé de *Lonchocarpus laxiflorus* PAPILIONACEAE<sup>158</sup> présente un spectre de RMN du proton très semblable à celui de la molécule isolée avec un signal attribué à un groupe méthoxyle supplémentaire et un spectre de masse avec 15 unités en plus.

Tous ces éléments nous permettent d'attribuer à ce nouveau composé une structure de désméthyl laxiflorane (46) pour laquelle nous n'avons pu préciser la position du groupement méthoxyle sur le cycle C.



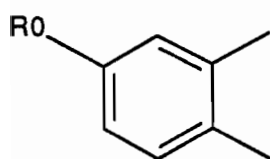
**46** Désméthyllaxiflorane  $R = \text{H}$  ou  $\text{CH}_3$   
 $R' = \text{CH}_3$  ou  $\text{H}$

3/ Les deux derniers composés isolés sont des polyphénols avec probablement un enchaînement non aromatique possédant un proton éthylénique ou aliphatique très déblindé à 5,50 ppm qui couple avec un autre proton alicyclique.

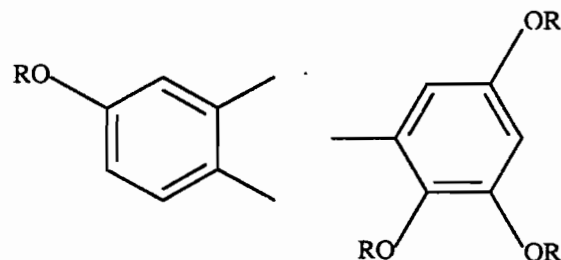
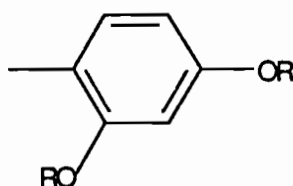
Sur le spectre de RMN  $^1\text{H}$  du composé AC3D(47), six protons aromatiques sont décomptés représentant d'après leurs déplacements chimiques et leur constante de couplage deux séries de trois protons dont deux sont en *ortho* l'un de l'autre et le troisième en *para* des deux autres. On note aussi la présence de deux ou trois hydroxyyles dont les protons sont échangeables en RMN du  $^1\text{H}$  avec le deutérium de l'eau deutériée. La masse de l'ion moléculaire est de 270 u.m. avec la présence d'une fragmentation caractéristique à M-15 confirmant la présence d'un méthoxyle qui résonne en RMN du  $^1\text{H}$  à 3,77 ppm.

Pour le composé AC8C (48) une substitution supplémentaire sur l'un des cycles aromatiques donne les déplacements et couplages pour trois protons couplant ensemble suivant le schéma précédant et deux protons indépendants sur un autre cycle. La masse de l'ion moléculaire est de 286 u.m. avec la présence d'une fragmentation caractéristique à M-15 confirmant la présence d'un méthoxyle qui résonne en RMN du  $^1\text{H}$  à 3,84 ppm.

Pour ces deux derniers composés, le degré de pureté des produits obtenus ne permet pas de connaître la nature exacte et le nombre de protons de la partie à haut champ du spectre de RMN du  $^1\text{H}$ .



**47** AC3D avec R = CH<sub>3</sub> ou H



**48** AC8C avec R = CH<sub>3</sub> ou H

### 3.1.5. Activité des molécules et des extraits isolés sur *Plasmodium berghei* infectant la souris

Les alcaloïdes des quatre ANNONACEAE actifs *in vitro* n'ont pas montré d'activité antipaludique sur la souris infectée par *P. berghei berghei* suivant le tableau N° 14. Les alcaloïdes totaux des feuilles de *Duguetia calycina* ont par ailleurs manifesté aux doses testées une forte toxicité sur les souris avec une DL50  $\approx$  500 mg.kg<sup>-1</sup>. La composition alcaloïdique des feuilles de cette plante est par ailleurs connue<sup>159</sup>, elle contient des alcaloïdes de type oxoaporphiniques. Les écorces de tiges de *Duguetia eximia* Diels ont fait l'objet d'une étude chimique montrant également la présence d'alcaloïdes oxoaporphiniques<sup>160</sup>. Les deux autres ANNONACEAE n'ont pas pu être identifiées à l'espèce par l'absence d'organes fertiles sur les échantillons d'herbiers. La composition alcaloïdique des espèces des genres *Guatteria* et *Anaxagorea* de Guyane française a fait l'objet de nombreuses publications dont une revue récente sur les Annonacées reprend les principaux résultats<sup>161</sup>.

Les alcaloïdes totaux d'*Hymenocallis tubiflora* présentent une faible activité antipaludique avec une toxicité associée qui peut correspondre à la présence d'alcaloïdes de type lycorine présents dans la famille des AMARYLLIDACEAE<sup>162</sup>, connus pour leur propriétés antitumorales mais malheureusement trop toxiques pour une application en clinique humaine.

Les alcaloïdes totaux de *Lycopodium cernuum* LYCOPODIACEAE ont montré une forte toxicité avec une mortalité dans les minutes suivant l'injection à 500 mg.kg<sup>-1</sup> en une seule injection et une faible activité antipaludique. Cette activité antimalarique n'a pas été confirmée dans un second essai à 100 mg.kg<sup>-1</sup> en quatre injections. La fraction alcaloïdique de cette plante contient deux alcaloïdes nicotiniques la cernuine et la lycocernuine<sup>163</sup> et une étude en CCM de la fraction alcaloïdique de notre échantillon montre la présence de deux alcaloïdes colorés en rouge brun par le réactif de Dragendorff.

	% parasitémie 96 heures	%d'inhibition 96 heures
Lot 1 (10 souris)témoin parasitémie	7	
Lot 2 (10 souris) témoin éthanol 100 µl éthanol 70° / souris / 4 jours en S.C.	11	
Lot 3 (10 souris) témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	0	100
Lot 4 (10 souris) MS 561 extrait éthanolique <i>Hymenocallis tubiflora</i> F. 40 mg/kg / souris / 4 Jours en S.C.	7	0
Lot 5 (10 souris)MS 561 extrait éthanolique <i>Hymenocallis tubiflora</i> Bu. 40 mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	13	0
	% parasitémie 72 heures *	%d'inhibition 72heures
Lot 1(10 souris)témoin parasitémie	18 ± 2	0
Lot 2(10 souris) témoin éthanol 100 µl éthanol 70°/souris/3Jours en S.C.	17 ± 2	12
Lot 3(10 souris)témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 3 jours en S.C.	0	100
Lot 4(10 souris) AC 183 extrait éthanolique <i>Dugetia calycina</i> F 100 mg/kg / souris / 3 Jours en S.C.	14 ± 3	20
	% parasitémie 96 heures	%d'inhibition 96 heures
Lot 1 (10 souris) témoin parasitémie	25	
Lot 2 (10 souris) témoin éthanol 100 µl éthanol 70°/ souris / 4 jours en S.C.	24	4
Lot 3 (10 souris)témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	0	100
Lot 4 (8 souris) MS 561 alcaloïdes totaux <i>Hymenocallis tubiflora</i> Bu. 100 mg/kg / souris / 4 Jours en S.C.	16 une souris est morte	35
Lot 1 (10 souris) témoin parasitémie	14 ± 2	0
Lot 2 (10 souris) témoin éthanol 100 µl éthanol 70° / souris / 4 jours en S.C.	12 ± 3	12
Lot 3 (10 souris)témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	0	100
MS 123 Alc. tot. <i>Dugetia eximia</i> F. dissous dans l'éthanol à 70° injection S.C. de 3 doses/ 4 jours (Jo-J1-J2-J3)	Lot 4 (10 souris) 100 mg/kg 11 ± 2	23
	Lot 5 (10 souris) 50 mg/kg 8 ± 2	41
	Lot 6 (10 souris) 10 mg/kg 12 ± 1	11

**Tableau N°14 :** essais de plantes à alcaloïdes sur le modèle *Plasmodium berghei berghei* infectant la souris.

\* et \*\* : la quantité disponible d'alcaloïdes n'a pas permis d'effectuer le test dans les conditions prévues.

	% parasitémie 72 heures *	%d'inhibition 72heures
Lot 1(10 souris) témoin parasitémie	18 ± 2	0
Lot 2 (10 souris) témoin éthanol 100 µl éthanol 70°/ souris / 3Jours en S.C.	17 ± 2	12
Lot 3 (10 souris) témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 3 jours en S.C.	0	100
Lot 4 (10 souris)AC 183 alcaloïdes totaux de <i>Dugetia calycina</i> 100 mg/kg / souris / 3 jours en S.C.	12 ± 2	33
Lot 5 (10 souris) JJDG 7672 alcaloïdes totaux de <i>Guatteria sp</i> 100 mg/kg/souris/3 jours en S.C.	15 ± 3	14
Lot 6 (2 souris) JJDG 7680 alcaloïdes totaux ** de <i>Anaxagorea sp</i> 100 mg/kg / souris / 3 jours en S.C.	15 ± 1	18
	% parasitémie 5 jours	%d'inhibition 5 jours
Lot1 (5 souris) JFK 68 fraction éthéropétroléique de <i>Lycopodium cernuum</i> P.E. 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	17 ± 14	0
Lot 2 (5 souris) JFK 68 alcaloïdes totaux de <i>Lycopodium cernuum</i> P.E. 500 mg/kg / souris / 1 jours en S.C.	9 ± 4 trois souris sont mortes	58
Lot 3 (5 souris) JFK 68 alcaloïdes totaux de <i>Lycopodium cernuum</i> 100 mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	51 ± 30	0

**Tableau N°14 (fin):** essais de plantes à alcaloïdes sur le modèle *Plasmodium berghei berghei* infectant la souris.

\* et \*\* : la quantité d'alcaloïdes disponible n'a pas permis d'effectuer le test dans les conditions prévues.

Dans le tableau N°15 qui se trouve dans la partie expérimentale (pages 172 à 175), ont été regroupés les résultats concernant les fractions non alcaloïdiques des plantes issues pour la plupart du protocole général d'extraction :

La fraction butanolique de *Sapium ciliatum* EUPHORBIACEAE a montré une très forte toxicité avec une DL 50  $\approx$  100 mg.kg<sup>-1</sup> pour laquelle aucune activité antipaludique n'a été confirmée *in vivo*. Le genre *Sapium* contient des promoteurs de tumorigénèse, les esters du phorbol<sup>164</sup> qui pourraient être responsables de cette forte toxicité.

La fraction méthanolique de *Phyllanthus amarus* EUPHORBIACEAE présente une certaine toxicité avec une DL 50  $\approx$  500 mg.kg<sup>-1</sup>. Cette toxicité n'est accompagnée d'aucune activité antipaludique. Par contre, il a été montré récemment que cette plante pantropicale présentait un intérêt certain dans la guérison des hépatites virales chroniques humaines à virus de type B<sup>165</sup>.

La fraction butanolique de *Ludwigia hyssopifolia* ONAGRACEAE présente une certaine toxicité avec une dose létale 50 (DL50)  $<$  500 mg.kg<sup>-1</sup> mais toujours sans activité antipaludique. Cette plante n'a pas fait l'objet à notre connaissance d'études phytochimiques. Les tests chimiques préliminaires indiquent pour une espèce voisine *Ludwigia latifolia* (collection d'herbier HJ 1606) la présence de saponosides et de tannins dans les parties aériennes et d'hétéroside du kampférol et du quercétol dans les feuilles.

La cytotoxicité des feuilles d'*Eugenia* sp nov MYRTACEAE semble concentrée dans les fractions butanoliques et aqueuses *in vivo*. Les tests chimiques préliminaires sur cette espèce indiquent la présence abondante de saponosides et de tannins dans les feuilles.

Les cytotoxicités d'*Eichornia crassipes* PONTEDERIACEAE et *Sipanea pratensis* RUBIACEAE n'ont été retrouvées *in vivo* dans aucune des fractions testées.

Les activités antipaludiques de *Fagara rhoifolia* RUTACEAE et d'*Abuta bullata* MENISPERMACEAE n'ont pas été confirmées *in vivo*. Les deux extraits éthanolique des plantes ont montré une certaine toxicité sur les souris. La présence d'alcaloïdes isoquinoléiques<sup>166</sup> de nombreux types différents dans la première plante et d'alcaloïdes protoberbériques<sup>167</sup> dans la seconde peuvent expliquer cette toxicité.

Les bois de litières qui ont fait l'objet d'extractions par des solvants de différentes polarités n'ont pas montré d'activité antipaludique particulière.

Les quatre principaux composés isolés de *Andira coriacea* PAPILIONACEAE comme le montre le tableau N° 16, ne présentent pas d'activité antipaludique aux doses testées.

	% parasitémie 5 jours	%d'inhibition 5 jours
Lot 1 (10 souris) témoin solvant 100 µl DMSO / souris / 4Jours en S.C.	18 ± 6	
Lot 2 (10 souris) témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	0	100
Lot 3 (10 souris) MS 741 Biochanine-A isolée d' <i>Andira coriacea</i> 80 mg/kg/souris/4 jours en S.C.	18 ± 6	0
Lot 1 (10 souris) témoin solvant 100 µl DMSO / souris / 4Jours en S.C.	21 ± 9	
Lot 2 (10 souris) témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	0	100
Lot 3 (10 souris) MS 741 AC8C isolé d' <i>Andira coriacea</i> 100 mg/kg/souris/4 jours en S.C.	19 ± 6 sept souris sont mortes	9
Lot 4 (10 souris) MS 741 AC3D isolé d' <i>Andira coriacea</i> 100 mg/kg / souris/ 4 jours en S.C.	26 ± 9 deux souris sont mortes	0
Lot 5 (10 souris) MS 741 désméthyllaxiflorane isolé d' <i>Andira coriacea</i> 100 mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	22 ± 10	0

Tableau N°16 : essais de composés isolés de *Andira coriacea* sur le modèle *Plasmodium berghei yoelii* infectant la souris.

Une toxicité aiguë a été mesurée sur la biochanine A en injectant à un lot de dix souris une quantité de produit équivalente à  $160 \text{ mg.kg}^{-1}$  en sous cutané pendant un jour. Cette dose a provoqué la mort de deux souris dans les 10 jours qui ont suivi l'injection. Le composé AC8C s'est montré particulièrement toxique pendant les essais antipaludiques puisqu'à  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  pendant quatre jours trois souris sur dix du test ont survécu. La toxicité sur les souris d'une espèce voisine *Andira humilis* a été étudiée <sup>168</sup>. L'équipe brésilienne a montré que le précipité méthanolique de la fraction aqueuse des écorces de racines possède une forte toxicité aiguë en intrapéritonéale sur la souris pour des volumes d'extrait de  $0,25 \text{ ml.kg}^{-1}$  de poids de souris (mort de la première souris en soixante-douze heures dans des lots de trois souris). Par contre ces mêmes extraits absorbés par les souris par voie orale sous forme d'eau de boisson pendant soixante jours ne présentaient pas de toxicité. D'autre part, la même équipe décrit l'activité anthelminthique par voie orale de l'extrait aqueux des racines d'*Andira anthelmia* <sup>169</sup> sur des souris infestées par des cestodes et d'autres helminthes (identification des cestodes non précisée). Cet extrait administré pendant douze jours n'a pas occasionné de troubles particuliers liés à une intoxication des animaux. Les animaux ont été complètement débarrassés de leurs parasites et cela trois mois après le traitement. Ces différents éléments suggèrent une activité anthelminthique intéressante par voie orale des flavonoïdes isolés d'*Andira coriacea*. Les différentes fractions des autres bois de litières positifs aux tests *in vitro* n'ont pas montré d'activité antipaludique sur la souris par la voie sous-cutanée. La voie orale aurait été peut être plus proche de la façon dont les singes ont absorbé les copeaux de litière qui devaient souiller leur nourriture surtout à base de fruits. Une autre hypothèse peut être avancée sur la sensibilité différente des souris et des Saïmiri aux éventuels principes actifs antipaludiques présents dans les bois de ces arbres.

Parmi les plantes que nous avons étudiés, l'activité antipaludique constatée *in vitro* ne s'est pas confirmée *in vivo* aux doses testées. Toutefois un composé nouveau, le désméthyl laxiflorane, a été isolé d'*Andira coriacea*.

<i>Dieffenbachia seguina</i> (N.J. Jacquin) Schott	ARACEAE
<i>Monstera obliqua</i> Miquel	"
<i>Callichlamys latifolia</i> (Richard) K. Schumann	BIGNONIACEAE
<i>Jacaranda copaia</i> (Aublet) D. Don	"
<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nicholson	"
<i>Vismia cayennensis</i> (N.J. Jacquin) Persoon	CLUSIACEAE
<i>Vismia guianensis</i> (Aublet) Choisy	"
<i>Vismia latifolia</i> (Aublet) Choisy	"
<i>Vismia sandwithii</i> Ewan	"
<i>Pavonia flavispina</i> Miquel	MALVACEAE
<i>Inga alba</i> (Swartz) Willdenow	MIMOSACEAE
<i>Inga bourgoni</i> (Aublet) de Candolle	"
<i>Inga pezizifera</i> Benthams	"
<i>Cecropia obtusa</i> Trecul	MORACEAE
<i>Psidium guajava</i> Linnaeus	MYRTACEAE
<i>Vataireopsis surinemensis</i> Lima	PAPILIONACEAE
<i>Plantago major</i> Linnaeus	PLANTAGINACEAE
<i>Faramea guianensis</i> (Aublet) Bremekamp	RUBIACEAE
<i>Cissus erosa</i> L.C. Richard	VITACEAE
<i>Renalmia guianensis</i> Maas	ZINGIBERACEAE
<i>Renalmia monosperma</i> Miquel	"

Tableau N°17 : Plantes leishmanicides des "Pharmacopées traditionnelles de Guyane"

Tableau N°18 : Plantes leishmanicides des Noirs Marrons

N h MS	FAMILLE	Genre	Espèce	Nom vern S	Nom vern B	Nom vern D
561	Amaryllidaceae	<i>Hymenocallis</i>	<i>tubiflora</i> Salisbury			bumbataja
517	Bignoniaceae	<i>Jacaranda</i>	sp			jasimanboon
702	Dilleniaceae	<i>Davilla</i>	<i>aspera</i> (Aublet) R. Benoist	fayatataj		
271		<i>Dolioscarpus</i>	<i>dentatus</i> (Aublet) Standley	fajatataj		
235	Mimosaceae	<i>Inga</i>	sp	fejifinga		

### 3.2. SUBSTANCES NATURELLES A ACTIVITE ANTILEISHMANIENNE

#### 3.2.1. Inventaire des plantes présumées antileishmaniennes de Guyane Française et du Surinam

Dans les pharmacopées des groupes amérindiens et créole de Guyane<sup>129</sup>, vingt et une plantes leishmanicides ont été recensées ( tableau N° 17). Dans l'étude encore en cours des pharmacopées des Noirs Marrons du Surinam, cinq plantes leishmanicides sont recensées sous leurs noms vernaculaires (tableau N° 18).

#### 3.2.2. Criblage sur *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*

Préalablement au criblage antileishmanien de notre programme, Davioud<sup>170</sup> sous la direction de Moretti a testé sur *Leishmania mexicana amazonensis* dans le modèle promastigote les décoctions de trois des plantes présumées leishmanicides : les feuilles de *Gustavia angusta* , les feuilles de *Monstera obliqua* , les tiges de *Vataireopsis speciosa* . Dans ce test, *G. angusta* et *V. speciosa* présentent une certaine activité à des concentrations importantes de l'ordre de 2 à 4 mg.ml<sup>-1</sup> de milieu. Un essai complémentaire a été effectué avec des pastilles de papier filtre imprégnées de l'extrait éthanolique de *G. angusta* et un extrait éthéré de chrysarobine extraite de *V. speciosa* puis mises à sécher pour éliminer les solvants. Mais les papiers filtres interfèrent avec le développement des leishmanies et les résultats obtenus sont moins fiables avec des concentrations actives difficiles à préciser du fait du mode particulier de dissolution. Nous avons repris les essais sur les trois plantes dans le criblage général. L'identification des espèces testées est donnée dans le tableau N° 19.

La difficulté d'interpréter les résultats des tests sur amastigotes infectant les macrophages apparait à la lecture du tableau N° 20 figurant dans la partie expérimentale (pages 176 à 180) donnant les résultats à la fois d'activité sur les deux modèles disponibles et la cytotoxicité sur les macrophages seuls. Seules les CLUSIACEAE, les RUBIACEAE autres que *Faramea guianensis*, la VITACEAE et la ZINGIBERACEAE semblent dépourvues de toute activité. Les autres plantes à des degrés divers peuvent être retenues pour un isolement de leurs principes actifs; aucun extrait toutefois n'apparait avoir un rapport activité/cytotoxicité comparable à celui des sels d'antimoine. Les extraits aqueux d' *Hymenocallis tubiflora*, *Jacaranda copaia*.

*Gustavia augusta*, *Doliocarpus dentatus* et *Cecropia obtusa* se comportent plutôt comme la pentamidine en cytoxiques non spécifiques. Les extraits de *Faramea guianensis*, *Callichlamys latifolia* et *Clidemia hirta* semblent plus spécifiquement actifs sur les amastigotes suivant le mode d'action des sels d'antimoine.

Famille	Espèce	N° d'herbier	organe
AMARYLLIDACEAE	<i>Hymenocallis tubiflora</i> Salibs	M.S. 561	Bu
ARACEAE	<i>Monstera</i> sp	J.F.K.12	F.
ASTERACEAE	<i>Bidens cynapiifolia</i> H.B.K.	J.F.K.11	P.E.
BIGNONIACEAE	<i>Callichlamys latifolia</i> (Rich.) Schum	P. et G.1973	T.
	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D. Don	C.F. 2397	F.
CLUSIACEAE	<i>Vismia</i> sp	M.S. 215	E.T.
	<i>Vismia</i> sp	M.S. 216	E.T.
	<i>Vismia cayennensis</i> (N.J. Jacquin) Persoon	J.F.K. 125	F.
			R.
			T.
DILLENACEAE	<i>Doliocarpus dentatus</i> (Aubl.) Standl.	M.S. 271	T.
LAMIACEAE	<i>Leonotis nepetaefolia</i> (L.) R. Brown	M.S. 619	P.E.
LECYTHIDACEAE	<i>Gustavia augusta</i> Alm.	M.S. 197	F.
CAESALPINIACEAE		M.S. 626	E.T.
MELASTOMACEAE	<i>Clidemia hirta</i> var. <i>elegans</i> (Aub.) Grisebach	J.F.K. 70	P.E.
MORACEAE	<i>Cecropia obtusa</i> Trecul	J.F.K. 1	F.
RUBIACEAE	<i>Faramea guianensis</i> (Aubl.) Bremer	J.J.D.G. 7489	F.
			T.
	<i>Faramea guianensis</i> (Aubl.) Bremer	J.J.D.G. 8834	F.
			T.
			R.
	<i>Faramea lourteigiana</i> Steyermark	M.S. 639	P.A.
	<i>Faramea lourteigiana</i> Steyermark	M.S. 639	R.
	<i>Faramea capillipes</i> Mueller-Argovirens	M.S. 653	P.A.
VITACEAE	<i>Cissus erosa</i> L.C. Rich	C.F. 2374	P.A.
ZINGIBERACEAE	<i>Renealmia guianensis</i> Mass	J.F.K. 5	Rh.

Tableau N°19 : Liste des plantes testées dans les essais antileishmaniens.

Organes testés: F.=feuille; T.=tige; R.=racine; Rh.=rhizome; P.A.=partie aérienne; P.E.=plante entière; E.T.=écorce de tige; Bu.=bulbe.

### 3.2.3. Fractionnement des plantes sélectionnées par guidage biologique

Sept plantes ont fait l'objet d'une extraction suivant le schéma général (tableau N°21) et *Faramea guianensis* du fait d'une présence importante de saponosides dans les feuilles a fait l'objet d'une extraction particulière visant à séparer les saponosides des chlorophylles et des autres constituants moins polaires. Le grand nombre de résultats positifs nous ont incité à la prudence et les résultats les plus marquants sur les plantes les moins connues ont retenu prioritairement notre attention.

#### \* *Faramea guianensis* RUBIACEAE

Les tableaux N° 22 et 23 (partie expérimentale, pages 181 à 183) montrent que les saponosides présents dans les fractions polaires de *Faramea guianensis* sont inactifs et que des composés présents dans les fractions apolaires (acétate d'éthyle et chlorure de méthylène) sont moyennement actifs. A l'examen en CCM des fractions apolaires, les composés actifs semblent être au nombre de deux. Seule une espèce du genre *F. cyanea* de la forêt amazonienne brésilienne a fait l'objet d'une étude phytochimique<sup>171</sup> et deux composés de type naphtopyrane ont été isolés.

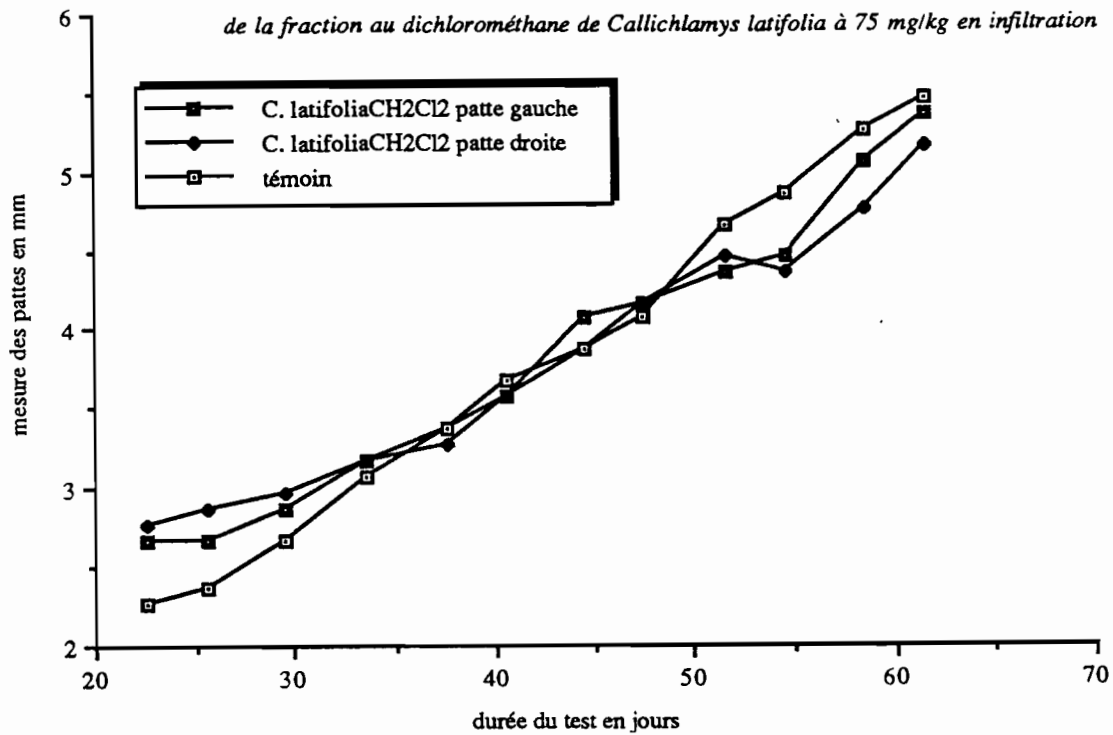
#### \* *Bidens cynapifolia* ASTERACEAE

Le tableau N° 24 (partie expérimentale, p.184 ) montre que dans *Bidens cynapifolia* seul l'extrait au chlorure de méthylène présente un intérêt avec un indice de survie des amastigotes de 21% à 30  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Mais une autre espèce du genre, *B. pilosa* a déjà été travaillée pour son activité présumée antipaludique par l'équipe du Professeur Balansard<sup>172</sup> et les dérivés acétyléniques extraits par guidage biologique sont des cytotoxiques dépourvus d'activité spécifiquement antipaludique *in vivo*.

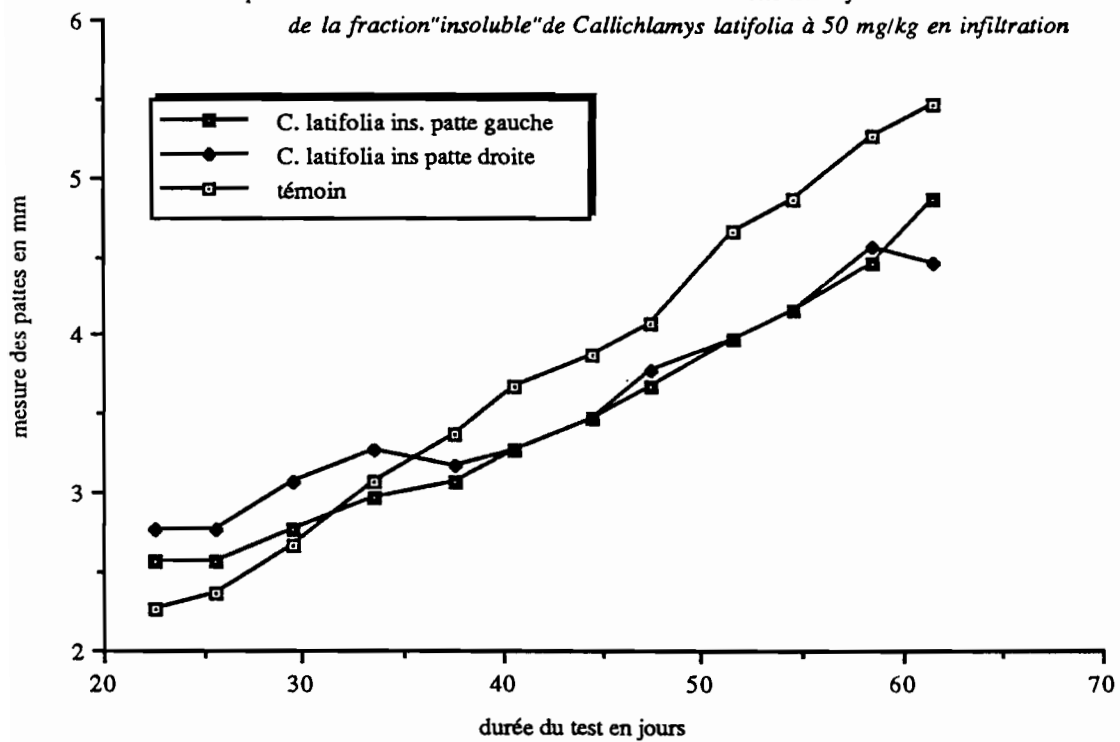
#### \* *Callichlamys latifolia* BIGNONIACEAE

Le tableau N° 25 (partie expérimentale, p. 185) indique que l'activité de *Callichlamys latifolia* est concentrée dans la fraction extraite au dichlorométhane avec une DE50  $\approx$  20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Ce test a été refait dans les conditions du laboratoire de Châtenay-Malabry et l'extrait est complètement inactif à 30  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Cette inactivité a été confirmée par les tests *in vivo* effectués en infiltration sur la fraction extraite au dichlorométhane et sur l'insoluble résultant du partage de l'extrait méthanolique entre le dichlorométhane et l'eau dite fraction "insoluble" (graphe N°2 et N°3).

Graphe N°2: Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de la fraction au dichlorométhane de *Callichlamys latifolia* à 75 mg/kg en infiltration



Graphe N°3: Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de la fraction "insoluble" de *Callichlamys latifolia* à 50 mg/kg en infiltration

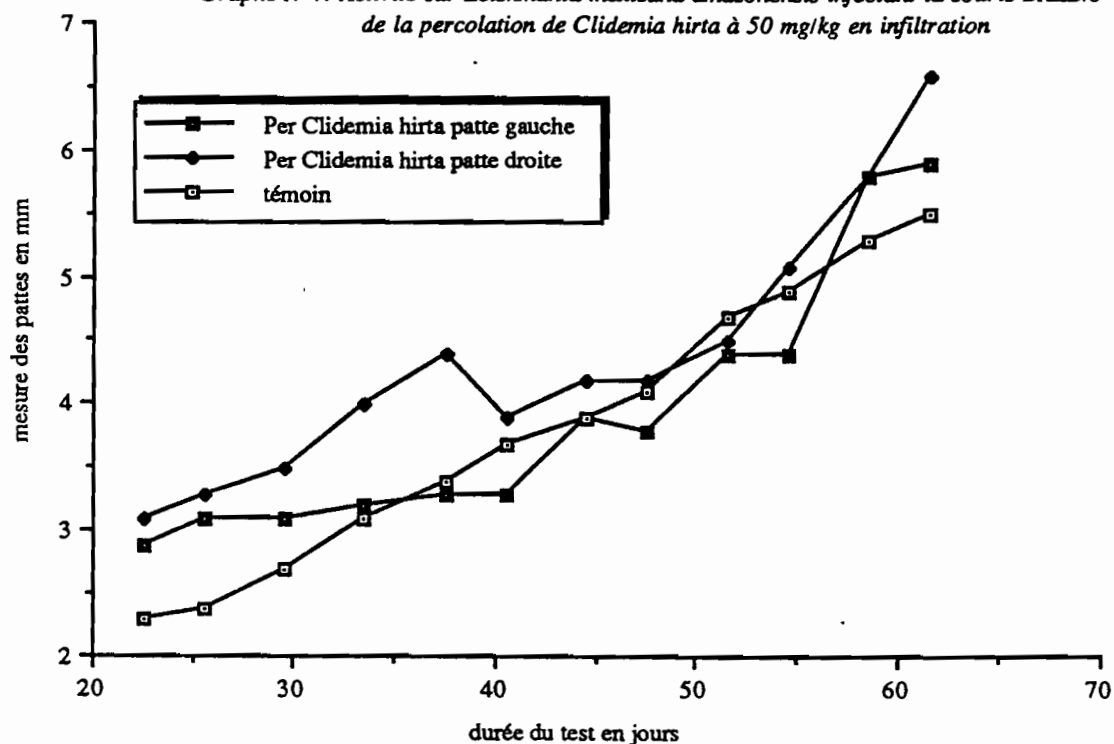


\* *Clidemia hirta* MELASTOMACEAE

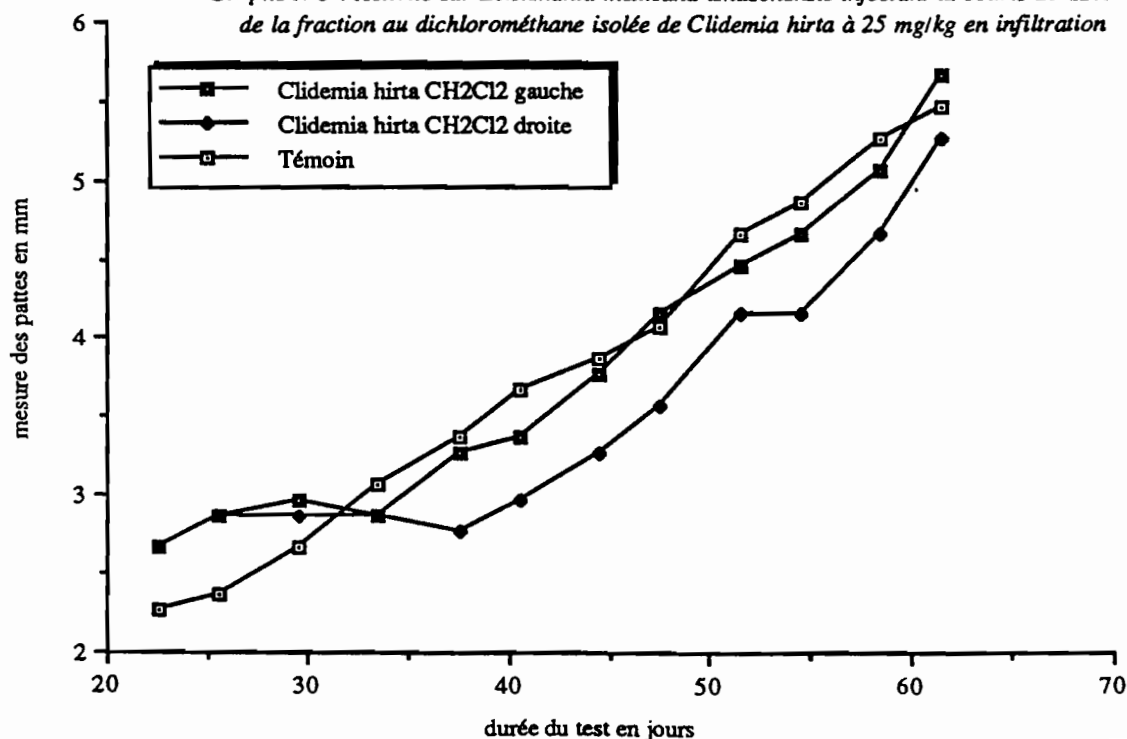
l'activité leishmanicide *in vitro* semblent partagée entre la fraction extraite au dichlorométhane et la fraction dite "insoluble" de *Clidemia hirta* comme le montre le tableau N°26 (partie expérimentale, p.186) avec des DE50 respectives de 10 et 30  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ . Par contre un deuxième test effectué sur la fraction extraite au dichlorométhane a montré qu'elle était inactive à 10

$\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Cette plante de végétation secondaire très répandue dans la partie tropicale d'Amérique du sud n'a fait l'objet d'aucune étude chimique. Pour cette plante, un essai *in vivo* a été effectué sur la percolation éthanolique et sur la fraction extraite au dichlorométhane par infiltration dans les pattes des souris ( graphe N°4 et graphe N°5). La percolation éthanolique est fortement proinflammatoire et aucune des deux fractions n'a montré d'activité significative.

Graphe N°4 : Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de la percolation de *Clidemia hirta* à 50 mg/kg en infiltration



Graphe N°5 : Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de la fraction au dichlorométhane isolée de *Clidemia hirta* à 25 mg/kg en infiltration

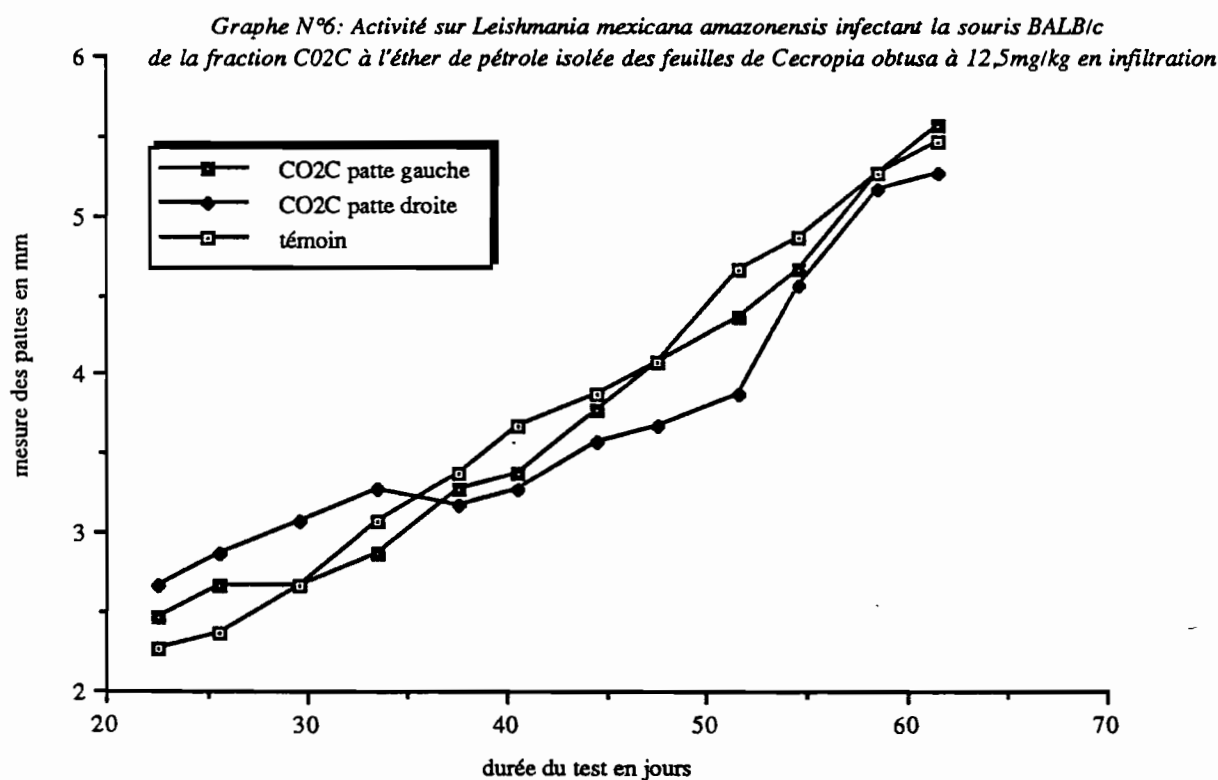


Extraits testés	Modèles expérimentaux	0.15	0.03	0.015	0.0075	0.0015 mg/ml
MORACEAE <i>Cecropia obtusa</i> C.O. 1A sol. = 15 mg/ml dans DMSO	Promastig. A survivants % Amastig. intracell. B I.S. Macrophages survivants %		100	100	100	100
		0	0	0	98	98
MORACEAE <i>Cecropia obtusa</i> C.O. 1B sol. = 15 mg/ml dans DMSO	Promastig. A survivants % Amastig. intracell. B I.S. Macrophages survivants % Promastig.		100	100	100	100
		0	0	98	98	98
MORACEAE <i>Cecropia obtusa</i> C.O. 1C sol. = 15 mg/ml dans DMSO	A survivants % Amastig. intracell. B I.S. Macrophages survivants %		100	100	100	100
					70	80
		0	0	0	98	98

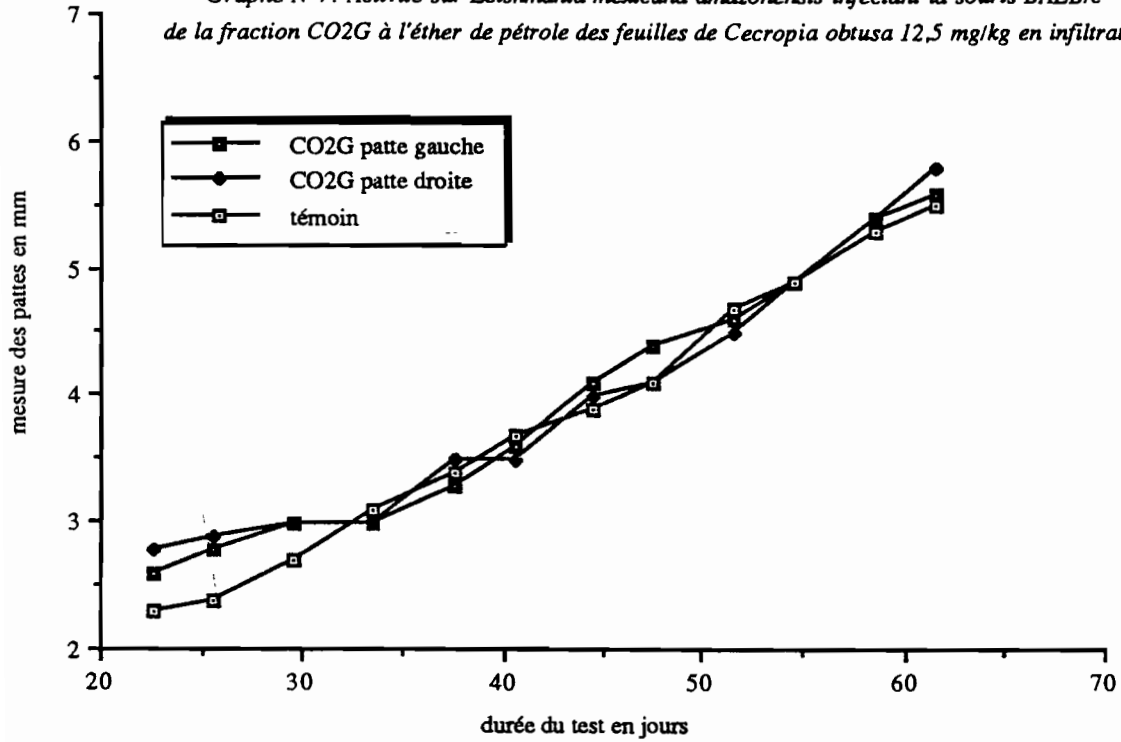
**Tableau N°28** : Activité des fractions isolées par C.C.M. de l'extrait éthéropétroléique de *Cecropia obtusa* sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*  
 modèle A = promastigotes en culture;  
 modèle B = amastigotes infectant les macrophages de souris.

\* *Cecropia obtusa* MORACEAE

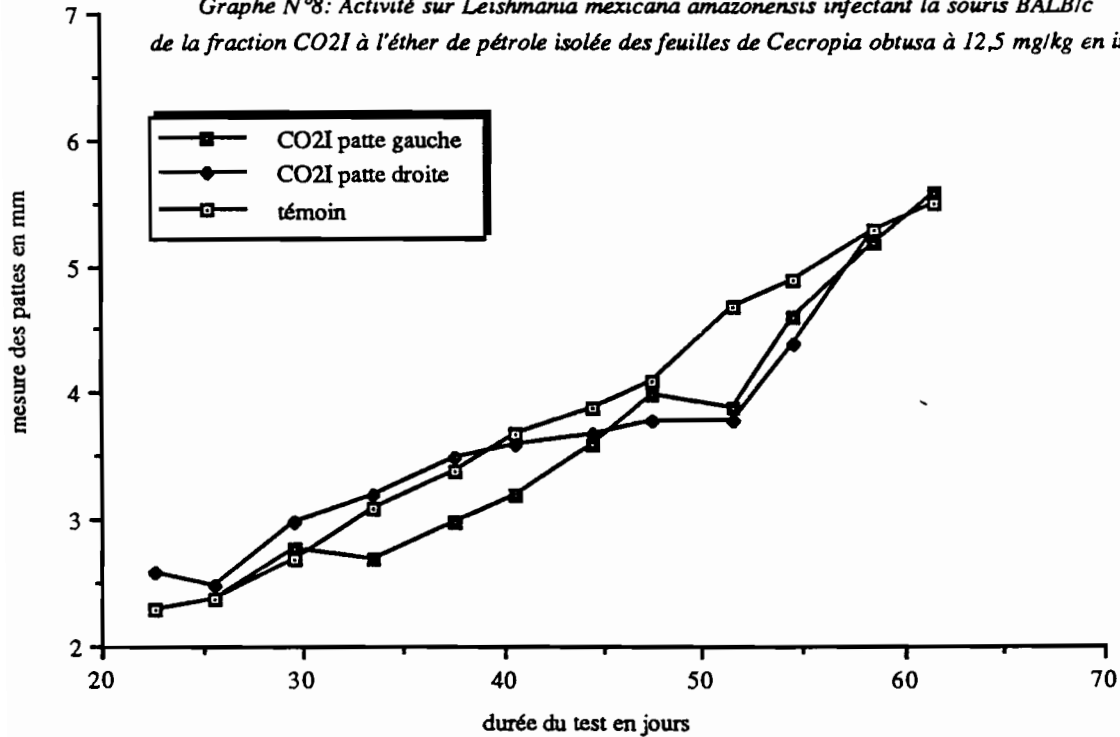
La fraction extraite à l'éther de pétrole des feuilles de *Cecropia obtusa*, arbre de régénération de la forêt secondaire, semble particulièrement cytotoxique avec une DE50  $\approx 1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (tableau N°27, partie expérimentale, p.187). Les fractions au dichlorométhane et dite "insoluble" avec respectivement 20% de survie à  $5\mu\text{g.ml}^{-1}$  et une DE50  $\approx 5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  semblent plus spécifiquement antileishmaniennes. Cet arbre n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique. Une espèce du genre, *C. obtusifolia* a été étudiée pour son activité hypotensive<sup>173</sup>. Une séparation des principaux constituants de la fraction à l'éther de pétrole par C.C.M. a été entreprise et les fractions obtenues ont été testés *in vitro* et *in vivo* (tableau N°28 et graphes N°6, N°7 et N°8). Aucune activité antileishmanienne significative n'a été dégagée de ces tests. La cytotoxicité a été confirmée *in vitro* sur les macrophages.



Graphe N°7: Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de la fraction CO2G à l'éther de pétrole des feuilles de *Cecropia obtusa* 12,5 mg/kg en infiltration



Graphe N°8: Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de la fraction CO2I à l'éther de pétrole isolée des feuilles de *Cecropia obtusa* à 12,5 mg/kg en infiltration



\* *Doliocarpus dentatus* DILLENACEAE

La fraction extraite au dichlorométhane concentre l'activité antileishmanienne de *Doliocarpus dentatus* avec 0 % de survie des amastigotes à 30  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  et 15 % à 15  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (tableau N°29, partie expérimentale, p.188). L'extraction par l'éther de pétrole donne un composé qui cristallise spontanément après réduction partielle du volume de solvant. Ce composé présente une action moyenne avec 40 % de survie à 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Seul le contenu flavonoïdique de la famille des Dilléniacées dont fait partie cette liane a été exploré dans une perspective chimio-taxonomique<sup>174</sup>.

\* *Leonotis nepetaefolia* LAMIACEAE

Un correspondant surinamien Heyde nous a signalé que la plante rudérale *Leonotis nepetaefolia* qui ne fait pas partie des inventaires précédents, était utilisée en tant qu'antileishmanien par les populations créoles du Surinam. Cette plante a fait directement l'objet d'un fractionnement et les différentes fractions se sont montrés totalement inactives (tableau N°30, partie expérimentale, p.189).

\* *Jacaranda copaia* BIGNONIACEAE

Les tableaux N°31 et N°32 (partie expérimentale, p.190 et 191) donnent les résultats des tests des différentes fractions issues des feuilles et des tiges de *Jacaranda copaia*. L'activité antileishmanienne est concentrée dans la fraction extraite au dichlorométhane des deux organes végétatifs avec un indice de survie de 0 % à la concentration de 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour les feuilles. La fraction aqueuse des feuilles semble avoir un certain intérêt avec une absence de toxicité sur les macrophages et un indice de survie des amastigotes de 0 % à 2  $\text{mg.ml}^{-1}$  et de 65 % à 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

Notre sélection a porté sur les fractions apolaires de *Faramaea guianensis*, la fraction extraite au dichlorométhane de *Doliocarpus dentatus* et sur les fractions extraites au dichlorométhane des feuilles et tiges de *Jacaranda copaia* compte tenu des résultats des chromatographies analytiques sur couches minces qui sont plus favorables sur ces fractions.

### 3.2.4. Structures et activités des composés isolés de *Faramea guianensis* (Aublet) Bremek

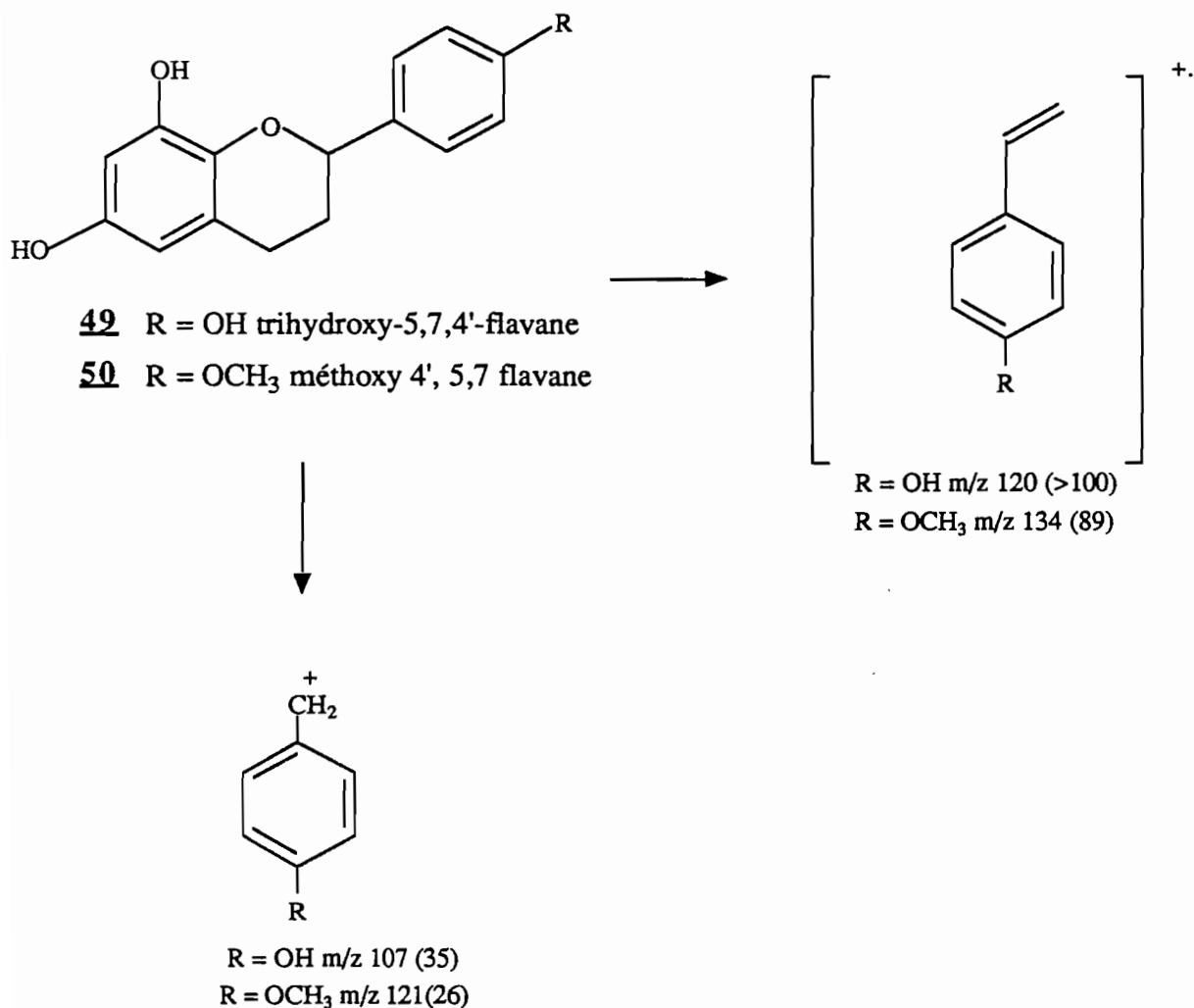
#### 3.2.4.1. Ecologie et usages

Arbrisseau du sous bois de la forêt primaire commun par place, cette plante est utilisée actuellement comme antileishmanien par les Wayāpi sous le nom de *ka'a yamulutu* (*ka'a* = plante et *yamulutu* = en groupe). Ils font brûler la plante entière dans un fragment de poterie pour enfumer et sécher les ulcères dus à la leishmaniose<sup>129</sup>.

#### 3.2.4.2. Description des flavanes isolés

Des fractions au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle, deux composés ont été isolés suivant le schéma d'extraction N°8 (partie expérimentale, p.143). Ils sont responsables de l'activité antileishmanienne de la plante suivant le tableau N°33 (partie expérimentale, p.192). Ces deux composés en chromatographie sur couches minces réagissent avec le chlorure ferrique en donnant la coloration brune caractéristique des phénols libres.

1/ Le spectre infra-rouge du composé (49) montre la présence de groupes hydroxyles et de noyaux aromatiques par les bandes d'absorption caractéristiques respectivement à  $3390\text{ cm}^{-1}$  et  $1605\text{ cm}^{-1}$ ,  $800\text{ cm}^{-1}$ . Sur le spectre de RMN du proton  $^1\text{H}$ , deux doublets avec une constante de couplage de 9 Hz à 6,68 ppm et 7,12 ppm indiquent la présence d'un noyau aromatique *para*-substitué. Les doublets à 5,67 ppm et 5,81 ppm avec une constante de couplage de 2,5 Hz suggèrent la présence d'un autre noyau aromatique avec des protons en position *meta*. Le doublet de doublet à 4,18 ppm à bas champ, avec les constantes de couplage de 12,5 Hz et 2,5 Hz et les trois multiplets à 1,83 ppm, 2,00 ppm et 2,52 ppm sont en faveur du noyau pyrane d'un squelette flavane. L'analyse du spectre de RMN du carbone  $^{13}\text{C}$  confirme cette proposition de structure. Le spectre de masse montre un ion moléculaire à  $m/z$  258 et les fragments caractéristiques à  $m/z$  120 et 107 correspondent au noyau C substitué par un hydroxyle.



La structure du composé (**49**) serait donc le trihydroxy-5,7, 4' flavane. Seul l'hétéroside de ce composé avec un xylose en 5 a été isolé des feuilles de *Buckleya lanceolata*<sup>175</sup>. Un composé voisin le diméthoxy- 5,7-hydroxy-4' flavane a été isolé d'un palmier par Okamoto et coll<sup>176</sup>.

2/ Le deuxième composé isolé (**50**) présente également une structure de flavane substitué par des hydroxyles. Mais sur le spectre de RMN du <sup>1</sup>H un singulet à 3,75 ppm intégrant pour trois protons, la présence d'un méthyl dans le spectre de RMN du <sup>13</sup>C, une masse moléculaire de 14 unités supplémentaires indiquent la présence d'un méthyle sur l'un des trois hydroxyles. Les fragments caractéristiques à m/z 134 et 121 correspondent au noyau C substitué par un méthoxyle. La structure du composé (**50**) serait celle du méthoxy 4'-dihydroxy-5,7 flavane. Ce composé n'a jamais été isolé et est donc un produit naturel nouveau.

### 3.2.4.3. synthèse du 5,7,4'trihydroxyflavane

Le caractère irrégulier de la présence des deux flavanes dans différents lots de drogue végétale nous a poussé à envisager la synthèse du flavane trihydroxylés. Elle se fait en une seule étape par réduction de la naringénine suivant le schéma N°9.

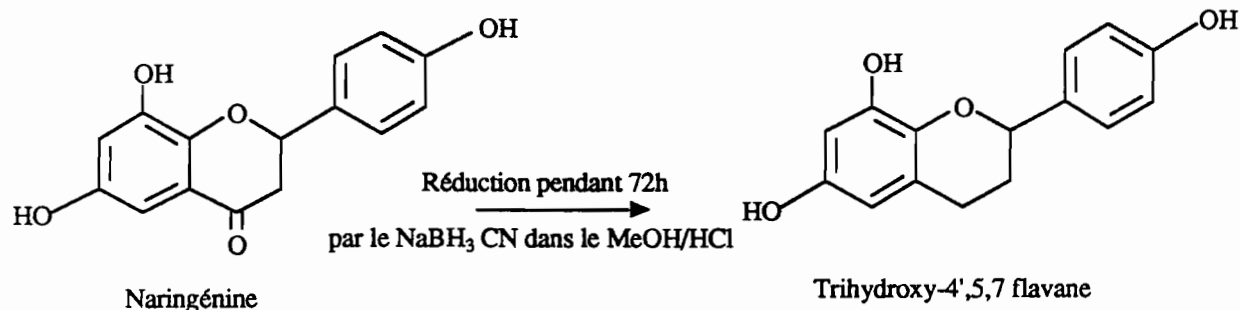


Schéma N°9

Cette synthèse avait déjà été réalisée à partir du triacétate de naringénine par Sweeny et Iacobucci<sup>177</sup> et directement à partir de la naringénine par Elliger<sup>178</sup>.

### 3.2.4.4. Activités

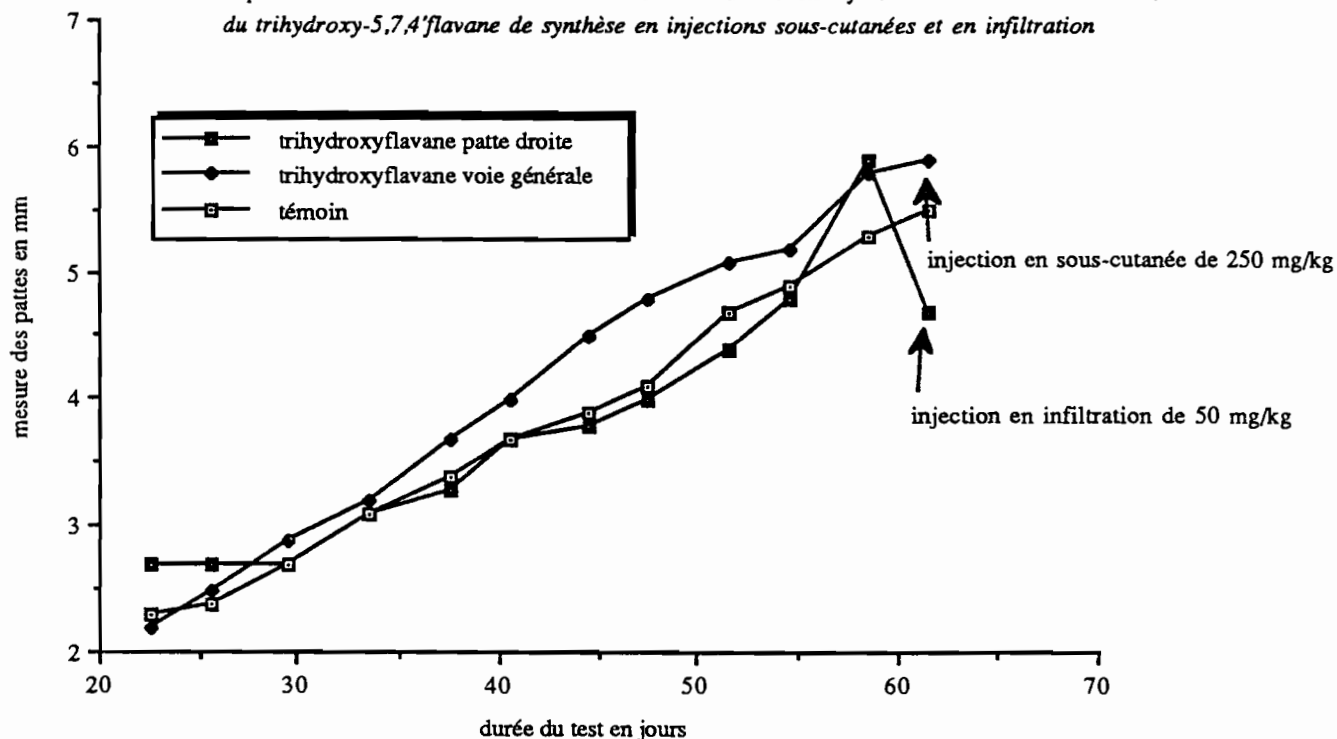
Le trihydroxyflavane soluble uniquement dans les solvants apolaires présente une faible activité *in vitro* à 60 µg.ml<sup>-1</sup> comme le montre le tableau N°34. Des essais complémentaires ont été conduits à partir du phénate solubilisé dans la soude décimormale, ce qui permet de tester la molécule à des concentrations supérieures aux précédentes. Dans ce cas le composé est cytotoxique.

Composés	modèles expérimentaux	20 µg/ml			
		-----			
Trihydroxyflavane de synthèse	Amastig. intracell. I.S.	94			
		-----			
Trihydroxyflavane de synthèse	Amastig. intracell. I.S.	60 µg/ml	40 µg/ml	20 µg/ml	
		70	103	100	
Trihydroxyflavane de synthèse	Amastig. intracell. I.S.	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	50 µg/ml
		toxique	toxique	toxique	57

Tableau N°34 : essais du trihydroxyflavane de synthèse sur le modèle amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* infectant des macrophages de souris *in vitro* au laboratoire de Parasitologie

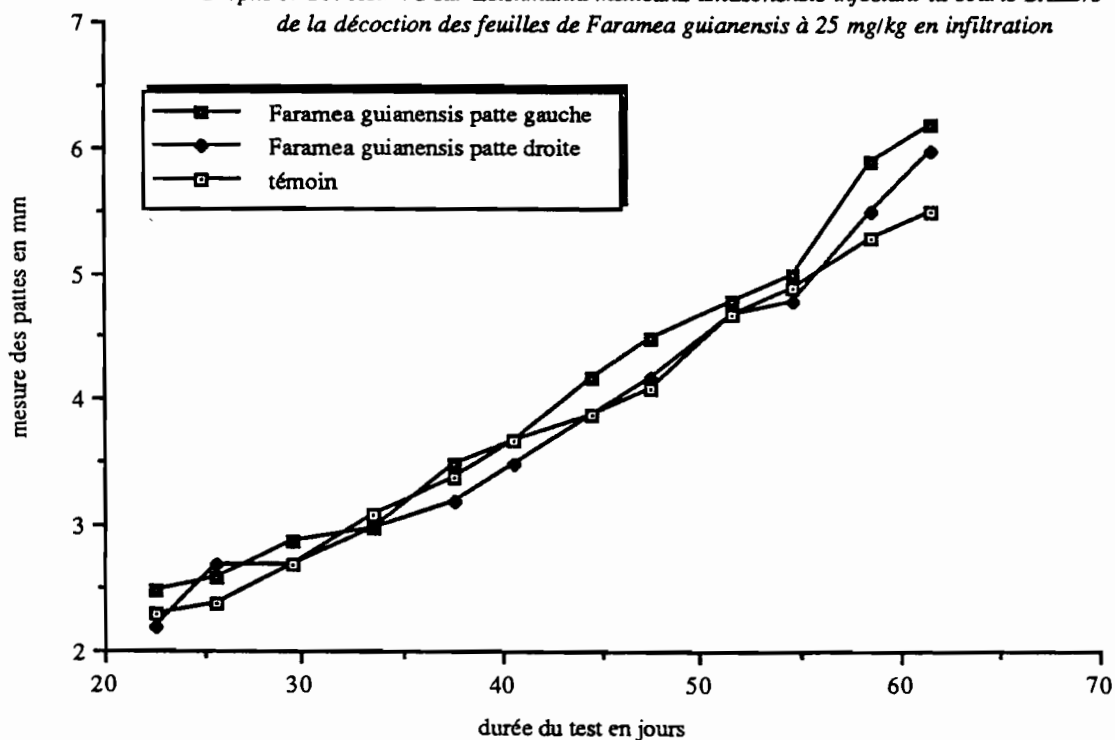
Les flavanes de ce type avec divers substituants sur les noyaux aromatiques dont des substituants aminés sur le carbone 6 ont fait l'objet de recherches pour leurs propriétés antivirales<sup>179, 180</sup>. Le flavane de synthèse a été testé sur la leishmaniose expérimentale cutanée de la souris à *Leishmania mexicana amazonensis* sans manifester d'activité significative (graphe N°9).

Graphe N°9: Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c du trihydroxy-5,7,4'flavane de synthèse en injections sous-cutanées et en infiltration



Pour nous assurer que nous n'avons pas éliminé des molécules actives de cette plante, la décoction des feuilles de *F. guianensis* a été testée *in vivo* en infiltration (graphe N°10). Ce test a confirmé l'absence d'activité sur la leishmaniose cutanée aux doses testées.

Graphe N°10: Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de la décoction des feuilles de *Faramea guianensis* à 25 mg/kg en infiltration



Pour compléter l'étude de l'activité de ce flavane, nous l'avons testé sur le paludisme expérimental de la souris à *Plasmodium yoelii* à  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  pendant deux jours: la toxicité du produit apparaît au troisième et entraîne la mort de deux souris sur cinq. Le produit n'a montré aucune action sur la parasitémie. Notre collègue Chantraine a testé ce flavane au laboratoire de Parasitologie du centre ORSTOM de Montpellier sur *Trypanosoma brucei brucei* infectant la souris à la dose de  $88 \text{ mg.kg}^{-1}$  pendant 4 jours. La moitié des souris sont mortes pendant les injections et le composé n'a pas fait baisser la parasitémie des animaux.

### **3.2.5. Structures et activités des composés isolés de *Doliocarpus dentatus* (Aublet) Standley**

#### **3.2.5.1. Ecologie et usages**

Les espèces du genre *Doliocarpus* sont de grosses lianes communes en forêt primaire et secondaire ainsi qu'en bordure de savane. Les *Doliocarpus* sont connues surtout pour leur sève abondante qui est bue par les chasseurs en forêt lorsque les criques sont trop éloignées du lieu de chasse<sup>129</sup>. Ces lianes sont utilisées contre la leishmaniose par les Saramaka sous le nom de *faya tataj* (*tataj* = liane et *faya* = feu). Les tiges réduites en poudre sont appliquées sur les ulcères leishmaniens.

#### **3.2.5.2. Triterpènes : acide bétunilique, bétuline et aldéhyde de la bétuline**

##### **3.2.5.2.1. Description des molécules**

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  des trois premiers composés isolés de la tige de cette liane (schéma d'extraction N°10; partie expérimentale, p.147) comportent de nombreux méthyles à champ fort. De plus l'absence de protons aromatiques nous a orienté vers la famille des terpènes. Les spectres de masse en impact électronique avec les fragmentations caractéristiques à  $m/z$  220,  $m/z$  207 et  $m/z$  189 ont confirmé ce choix : les trois triterpènes appartiennent à la famille des dérivés du lupane, le fragments à 207 et sa forme déshydratée à 189 sont des fragments majoritaires (schéma N°11). Ces résultats sont caractéristiques des dérivés de l'acide bétulinique<sup>181</sup>

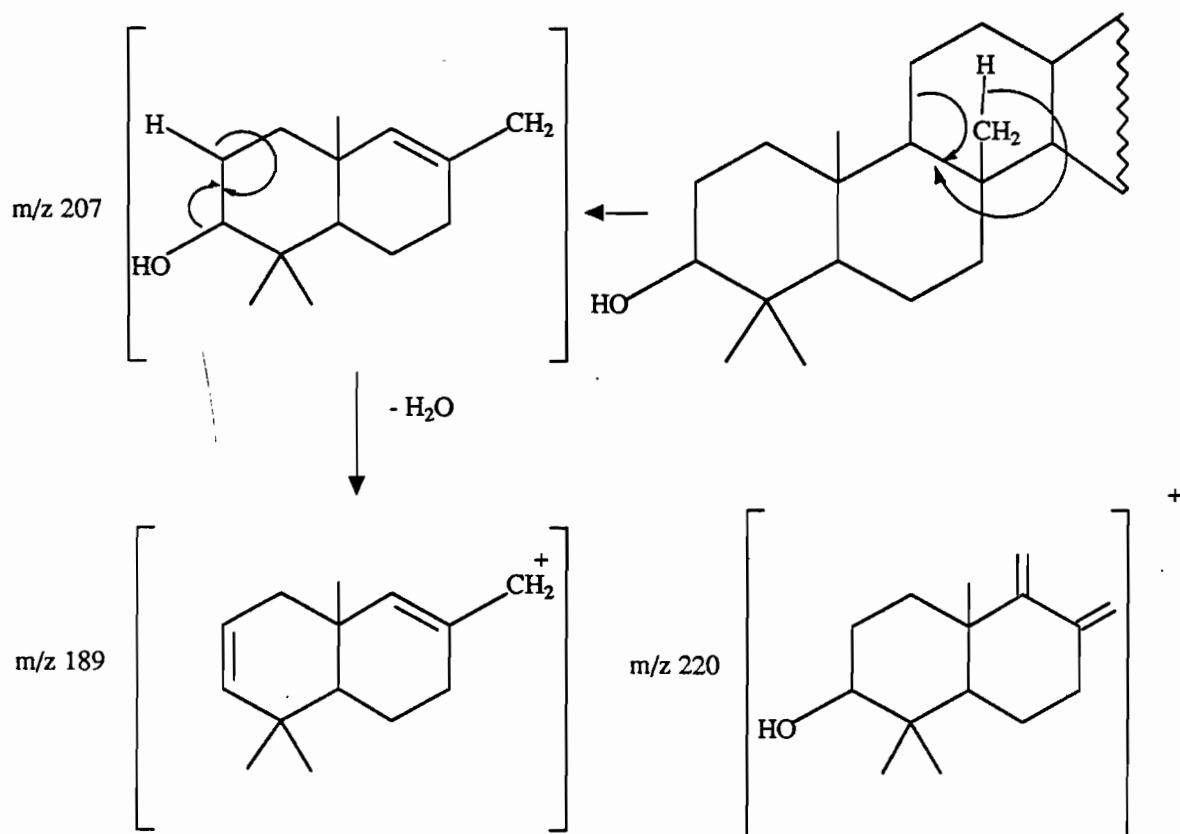
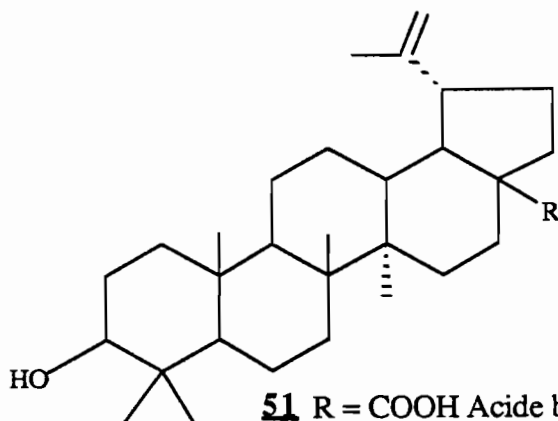


Schéma N°11

1/ Le premier composé (51) qui est très abondant surtout dans la fraction à l'éther de pétrole a cristallisé spontanément. Son spectre de RMN du  $^{13}C$  et sa masse moléculaire l'ont identifié comme l'acide bétulinique, composé extrêmement fréquent dans le règne végétal. Les signaux du spectre du  $^{13}C$  de l'acide bétulinique (schéma N°12) sont en accord avec les résultats de la littérature<sup>182</sup>.





**51** R = COOH Acide bétunilique

**52** R = CH<sub>2</sub>OH Bétuline

**53** R = CHO Aldéhyde de la bétuline

### 3.2.5.2.2. Activités

#### *In vitro*

Seuls la bétuline et son aldéhyde ont été testés *in vitro*. Ce dernier s'est révélé actif avec un indice de survie des amastigotes compris entre 5 et 12 % à 60 µg.ml<sup>-1</sup> (tableau N°35), mais à cette dose nous avons observé une certaine toxicité sur les macrophages qui sont altérés, arrondis ou détachés du support.

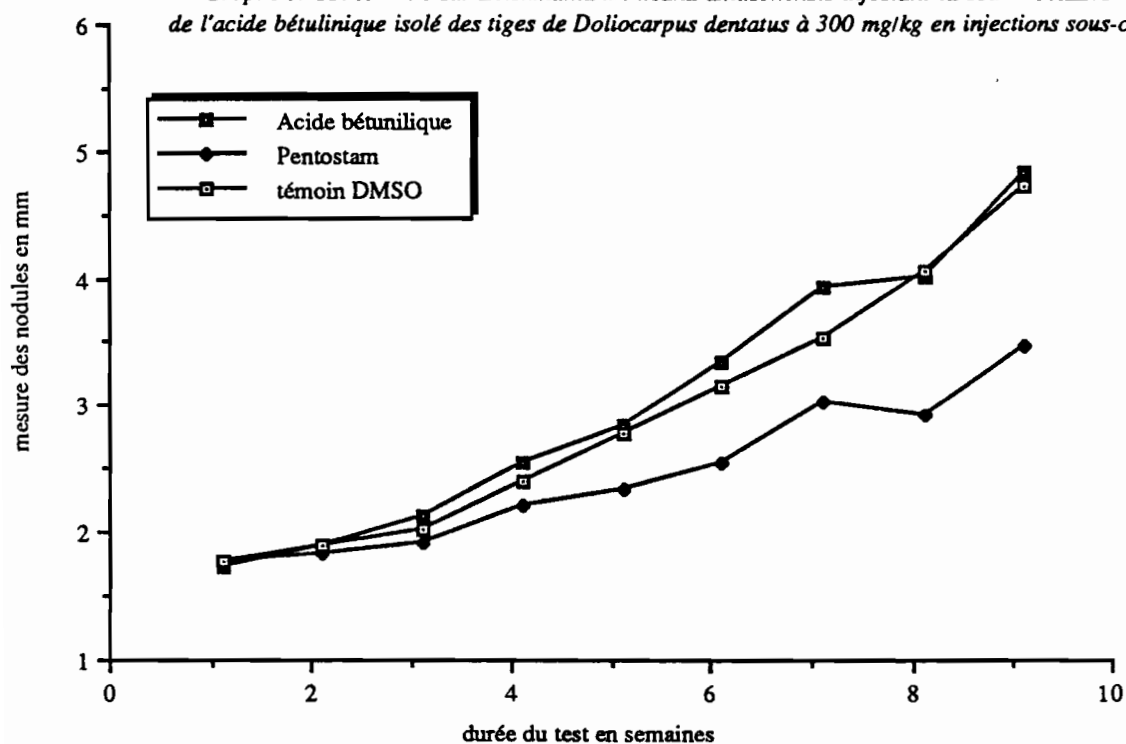
Composés	modèles expérimentaux	30 µg/ml		
		15 µg/ml		
aldéhyde de la bétuline isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	53	85	
		60 µg/ml	30 µg/ml	15 µg/ml
aldéhyde de la bétuline isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	12	42	111
		60 µg/ml	30 µg/ml	15 µg/ml
aldéhyde de la bétuline isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	5	91	120
		30 µg/ml		
bétuline isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	105		

**Tableau N°35** : essais de la bétuline et de l'aldéhyde de la bétuline isolés de *Doliocarpus dentatus* sur le modèle amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* infectant des macrophages de souris *in vitro* au laboratoire de Parasitologie de Chatenay-Malabry.

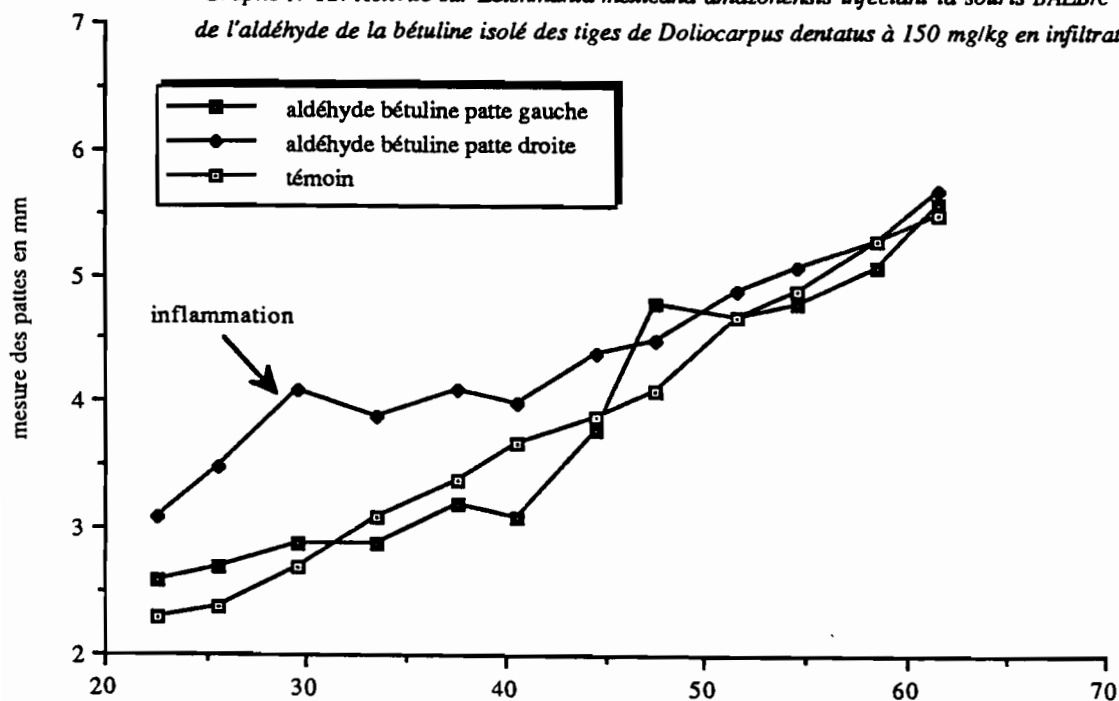
*In vivo*

L'acide bétulinique et l'aldéhyde de la bétuline ont été testés *in vivo*, la bétuline par la voie générale et l'aldéhyde en infiltration (graphe N°11 et 12). Aucune de ces molécules ne s'est montrée active. L'aldéhyde à la dose unique de 150 mg.kg<sup>-1</sup> a provoqué un phénomène inflammatoire important et persistant qui a gêné la mesure de l'épaisseur des pattes alors que l'injection de l'acide bétulinique en SC à 300 mg.kg<sup>-1</sup> pendant cinq jours n'a provoqué aucun trouble cutané chez les souris soumises au test. Cette toxicité particulière de l'aldéhyde de la bétuline pourrait s'expliquer par le caractère réactif de la fonction aldéhyde.

Grappe N°11: Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de l'acide bétulinique isolé des tiges de *Doliocarpus dentatus* à 300 mg/kg en injections sous-cutanées



Grappe N°12: Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de l'aldéhyde de la bétuline isolé des tiges de *Doliocarpus dentatus* à 150 mg/kg en infiltration



### 3.2.5.3. Lignanes : liriorésinol B, pinorésinol et médiorésinol

#### 3.2.5.3.1. Description des molécules

Le schéma d'extraction précédent montre qu'à côté des triterpènes dérivés du lupane, trois composés aux caractéristiques physico-chimiques semblables ont été isolés de la fraction extraite de *Doliocarpus dentatus* par le dichlorométhane. Les fragments caractéristiques des spectres de masses, les spectres de RMN du  $^1\text{H}$  permettent de proposer une structure de lignanes furofuranniques possédant des radicaux méthoxyle et hydroxyle dont les positions sont données par l'analyse des fragmentations du spectre de masse proposée dans le schéma N°13<sup>184,185</sup>.

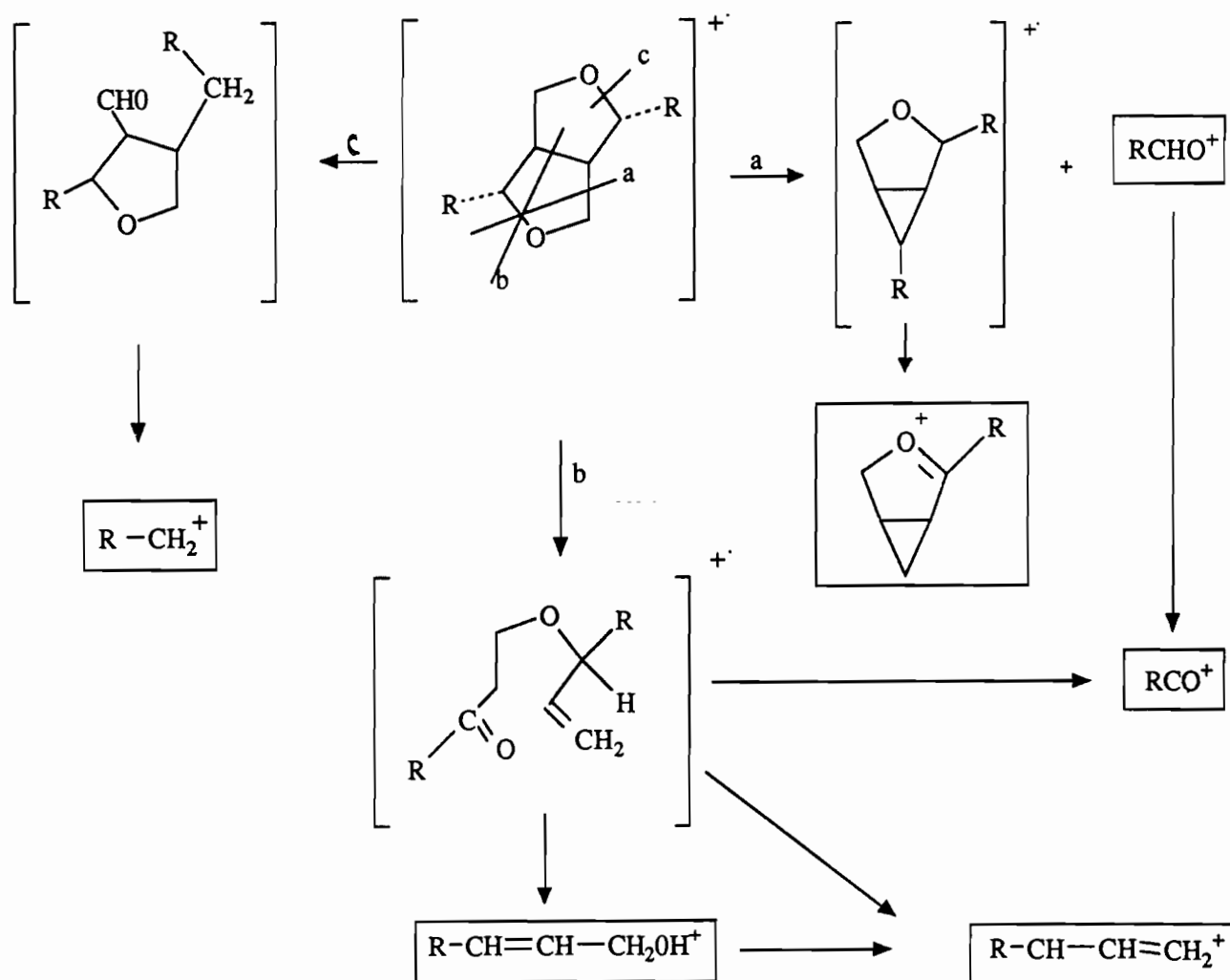
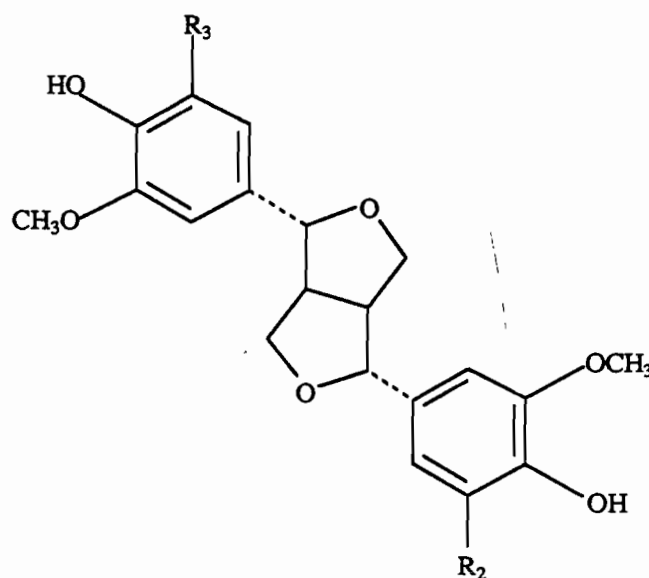


Schéma N°13 : Fragmentations en spectrométrie de masse des lignanes furofuranniques

Les lignanes sont respectivement identifiés comme étant le lirioreésinol B (**54**), le médioreésinol (**55**) et le pinoreésinol (**56**). Un échantillon authentique de lirioreésinol B naturel extrait de *Vinca minor* nous a été confié par Mme Kunesch et nous a permis de vérifier l'identité des deux composés par comparaison de leur R<sub>f</sub> en C.C.M. Nous n'avons pas pu déterminer les configurations absolues des trois composés par manque de produit.



- 54** R1 et R2 = CH<sub>3</sub>O      Syringarésinol ou lirioreésinol B  
**55** R1 = H et R2 = CH<sub>3</sub>O      Médioreésinol  
**56** R1 et R2 = H      Pinoreésinol

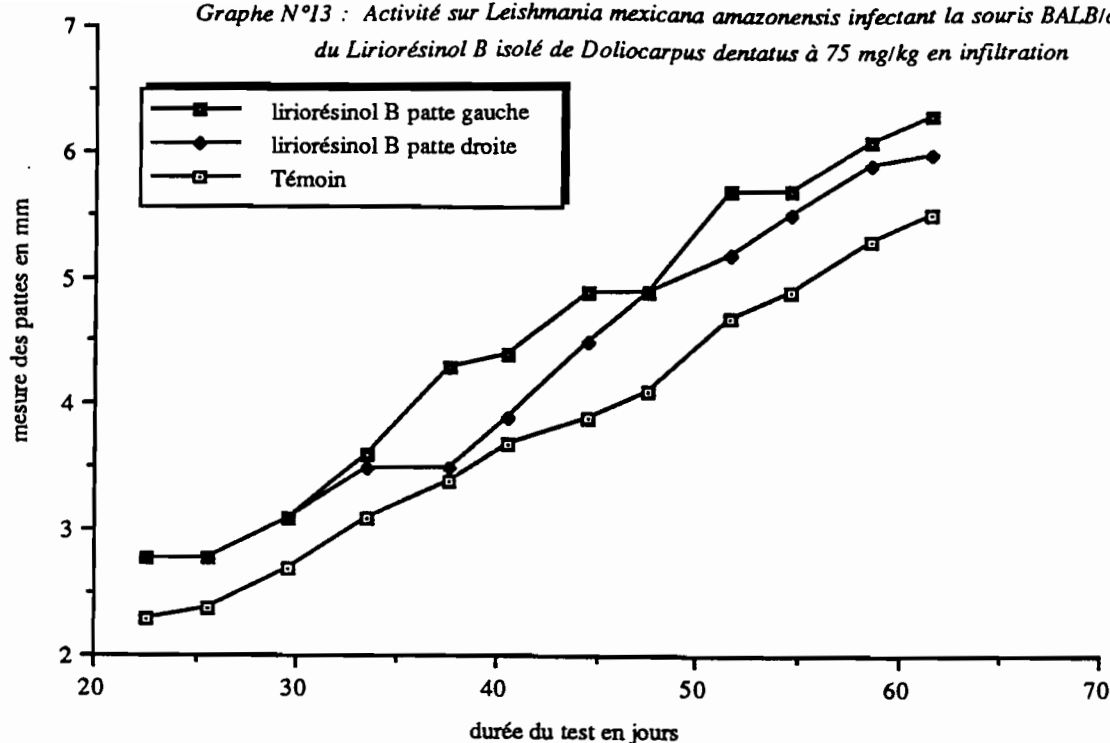
### 3.2.5.3.2. Activités

Ces lignanes ont montré une activité moyenne dans les différents essais que nous avons effectués *in vitro*. Le pinoreésinol à 60 µg.ml<sup>-1</sup> n'a pas montré d'action significative. Par contre à la même dose, les deux autres lignanes le lirioreésinol B et le médioreésinol ont inhibé la survie des amastigotes dans les macrophages à 50% en moyenne sans toxicité notable (tableau N°36). Toutefois au delà de 125 µg.ml<sup>-1</sup>, ils se sont montrés toxiques pour les macrophages. L'activité *in vivo* des deux derniers composés a été évaluée. Ils sont complètement inactifs à la dose unique de 75 mg.kg<sup>-1</sup> en infiltration (graphes N°13 et 14).

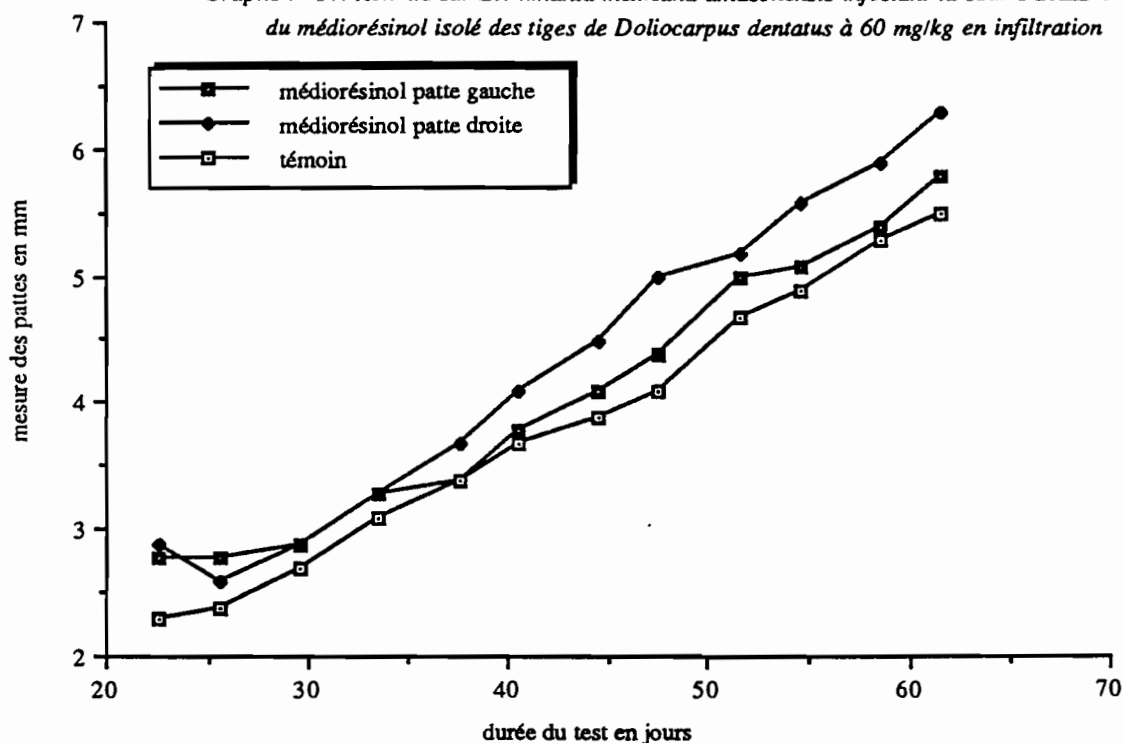
Composés	modèles expérimentaux	60 µg/ml			
Pinorésinol isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	82			
		60 µg/ml			
Liriorésinol B isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	64			
		60 µg/ml                      30 µg/ml                      15 µg/ml			
Liriorésinol B isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	45	50	88	
		500 µg/ml      250 µg/ml                      125 µg/ml      25 µg/ml			
Liriorésinol B isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	toxique	toxique	toxique	34
		60 µg/ml                      30 µg/ml                      15 µg/ml			
Liriorésinol B isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	44	69	104	
		60 µg/ml			
Liriorésinol B isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	56			
		60 µg/ml			
Médiorésinol isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	52			
		60 µg/ml                      30 µg/ml                      15 µg/ml			
Médiorésinol isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	67	70	88	
		500 µg/ml      250 µg/ml                      125 µg/ml      25 µg/ml			
Médiorésinol isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	toxique	toxique	51	77
		60 µg/ml                      30 µg/ml                      15 µg/ml			
Médiorésinol isolé de <i>Doliocarpus dentatus</i>	Amastig. intracell. I.S.	42	104	92	

**Tableau N°36** : essais des lignanes isolés de *Doliocarpus dentatus* sur le modèle amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* infectant des macrophages de souris *in vitro* au laboratoire de Parasitologie de Chatenay-Malabry.

Graphe N°13 : Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c du Liriorésinol B isolé de *Doliocarpus dentatus* à 75 mg/kg en infiltration



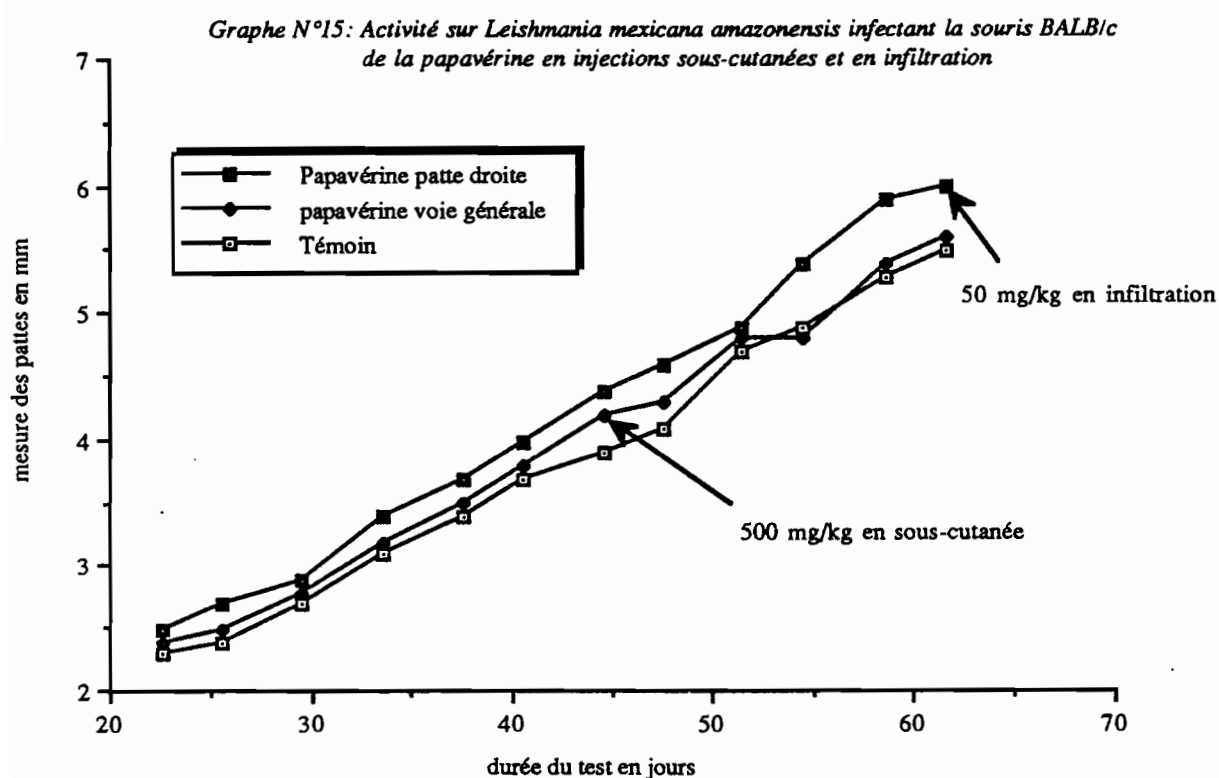
Graphe N°14 : Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c du médiorésinol isolé des tiges de *Doliocarpus dentatus* à 60 mg/kg en infiltration



### 3.2.5.3.3. mécanisme d'action probable

Les lignanes furofuranniques sont doués de nombreuses propriétés biologiques<sup>186</sup>, mais la plus remarquable d'entre elles est la capacité d'inhiber la phosphodiesterase de l'AMP cyclique<sup>187</sup> à des concentrations comparables aux composés de référence que sont la papavérine ou la caféine. Deux des lignanes isolés ici (le pinorésinol et le liriorésinol B ou syringarésinol) ont été testés avec succès pour cette activité. Comme nous l'avons vu dans la première partie sur

les maladies, la voie métabolique de l'AMP cyclique a été explorée comme une des voies possibles d'action des molécules leishmanicides. Les essais effectués dans les travaux antérieurs sur les inhibiteurs de la phosphodiesterase l'ont été *in vitro*. Par analogie avec les effets des lignanes, il nous a paru intéressant d'explorer l'activité de la papavérine *in vivo* en infiltration. La papavérine ne montre aucune activité significative sur la souris infectée comme le montre le graphe N°15. Toutefois, il faudrait recommencer l'expérience soit avec les inhibiteurs de l'AMP cyclique seuls sur une longue durée soit en association avec les sels d'antimoine.



### 3.2.6. Structures et activités des composés isolés de *Jacaranda copaia* (Aublet) G. Don

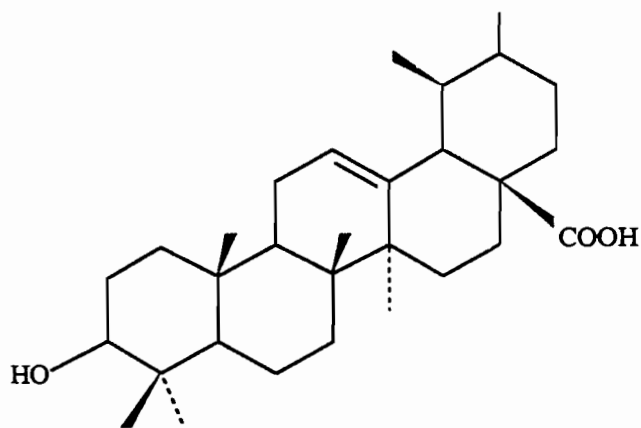
#### 3.2.6.1. Ecologie et usages

Il s'agit d'un arbre moyen, commun en forêt secondaire, plus rare en forêt primaire avec une belle floraison bleue. L'usage de cette plante contre le *pian*, ancien nom de la leishmaniose, est signalée depuis 1775 par le botaniste Aublet. Actuellement, les créoles de Saül utilisent les feuilles appliquées en emplâtre sur les ulcères de leishmaniose et les indiens Wayãpi font brûler les rameaux feuillus pour repousser les attaques d'insectes piqueurs<sup>129</sup>. Les Saramaka connaissent aussi cette espèce qu'ils utilisent localement contre les dermatoses.

#### 3.2.6.2. Acide ursolique

##### 3.2.6.2.1. Description de la molécule

Ce composé a été isolé en mélange avec le composé suivant dans les fractions extraites au dichlorométhane des écorces de tronc et des feuilles de cet arbre (schémas d'extraction N° 14 et 15 ; partie expérimentale, p.153 et 154). Seules des chromatographies sur couches épaisses ont permis laborieusement de l'isoler en très petites quantités juste suffisantes pour l'identifier et tester son activité. Le genre *Jacaranda* avait déjà été travaillé pour son activité antitumorale. De *Jacaranda caucana* ont été isolés par l'équipe de Farnsworth<sup>188,189</sup> plusieurs composés dont des triterpènes. Le spectre de masse de notre composé (**57**) donne les fragmentations caractéristiques à  $m/z$  248, 207 et 133 des triterpènes du groupe des ursanes<sup>181</sup>. Sa masse moléculaire à  $m/z$  456 et les intensités des pics de fragmentations caractéristiques l'identifient à l'acide ursolique déjà isolé de *Jacaranda caucana*.



**57** Acide ursolique

### 3.2.6.2.2. Activité de la molécule

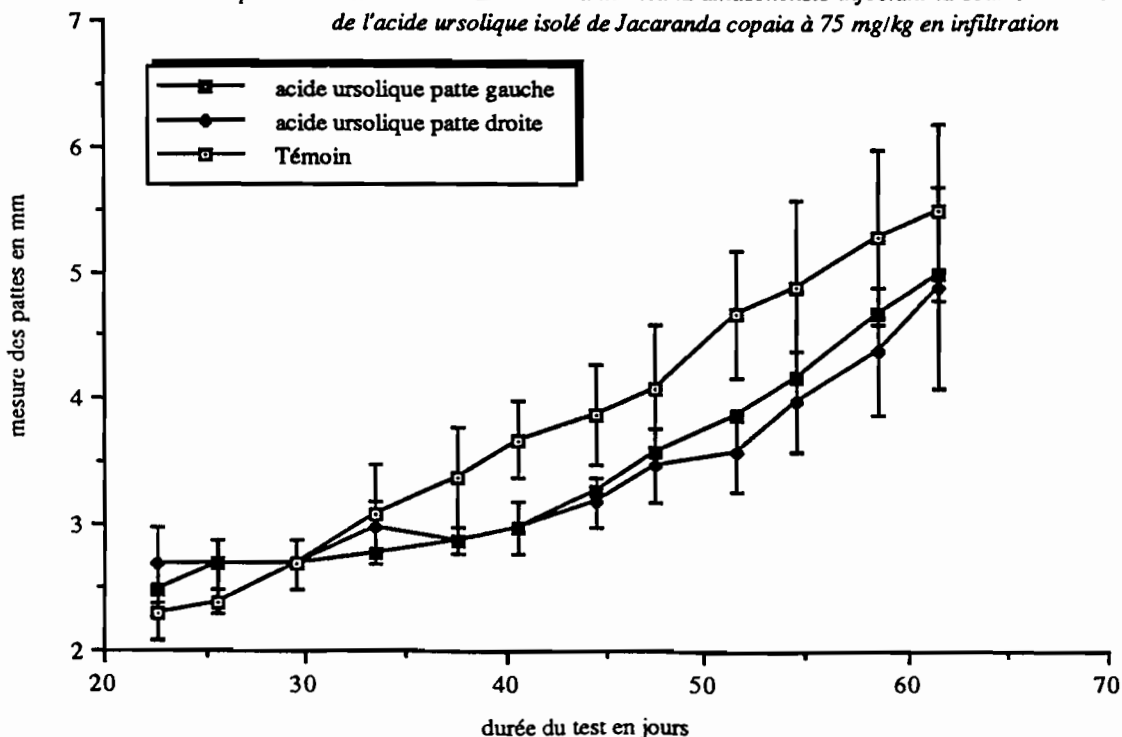
Comme le montre le tableau N°37, l'acide ursolique présente *in vitro* une activité variable en fonction de la provenance de la molécule (tiges ou feuilles) et donc de son degré de pureté. Dans le meilleur des cas, il est actif à  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  avec un indice de survie des amastigotes de 37%. Il paraît peu toxique sur les macrophages avec une destruction totale des macrophages à  $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dans un autre essai.

Composés	modèles expérimentaux	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
		60 $\mu\text{g}/\text{ml}$	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	15 $\mu\text{g}/\text{ml}$
acide ursolique (JCT 19B) isolé de <i>Jacaranda copaia</i>	Amastig. intracell. I.S.	2	41	37
acide ursolique (JCT 21) isolé de <i>Jacaranda copaia</i>	Amastig. intracell. I.S.	37	76	76

Tableau N°37 : essais de l'acide ursolique isolé de *Jacaranda copaia* sur le modèle amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* infectant des macrophages de souris *in vitro* au laboratoire de Parasitologie de Chatenay-Malabry.

Le test du composé *in vivo* montre une absence transitoire de développement des nodules leishmaniens à la fois sur la patte traitée d'une façon nette et aussi moins nettement sur la patte témoin (graphe N°16). Mais les écarts types sur les mesures de l'épaisseur des pattes non traitées recouvrent partiellement ceux des pattes des souris témoins. Pour une lecture plus aisée, sur le graphe ne figurent que les écarts types du lot témoin et dans le lot traité par l'acide ursolique que les écart types des pattes soumises au traitement.

Graphe N°16: Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de l'acide ursolique isolé de *Jacaranda copaia* à  $75 \text{ mg}/\text{kg}$  en infiltration

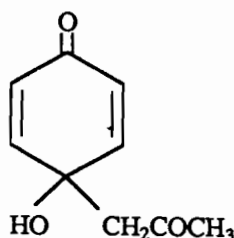


Les dérivés de l'ursane sont les composés principaux de l'extrait de *Centella asiatica*<sup>190</sup> qui est utilisé dans des topiques à activité protectrice anti-inflammatoire et cicatrisante. D'autre part, il a été signalé récemment<sup>191</sup> que l'indométacine, un anti-inflammatoire puissant inhibe la dissémination viscérale de la leishmaniose à *Leishmania major*. Un des modes d'action possibles de l'acide ursolique pourrait être son pouvoir anti-inflammatoire présumé.

### 3.2.6.3. La jacaranone

#### 3.2.6.3.1. Description de la molécule

Le composé majoritaire isolé de la fraction extraite au dichlorométhane de *Jacaranda copaia* est une molécule de bas poids moléculaire, avec un seul noyau aromatique qui correspond au composé breveté isolé de *Jacaranda caucana*<sup>192,193</sup> par l'équipe américaine et responsable de l'activité antitumorale contre la leucémie de la souris à lymphocytes P388. Il s'agit de la jacaranone (58), quinoïde s'apparentant aux benzoquinones.



**58** Jacaranone

#### 3.2.6.3.2. Activité de la molécule

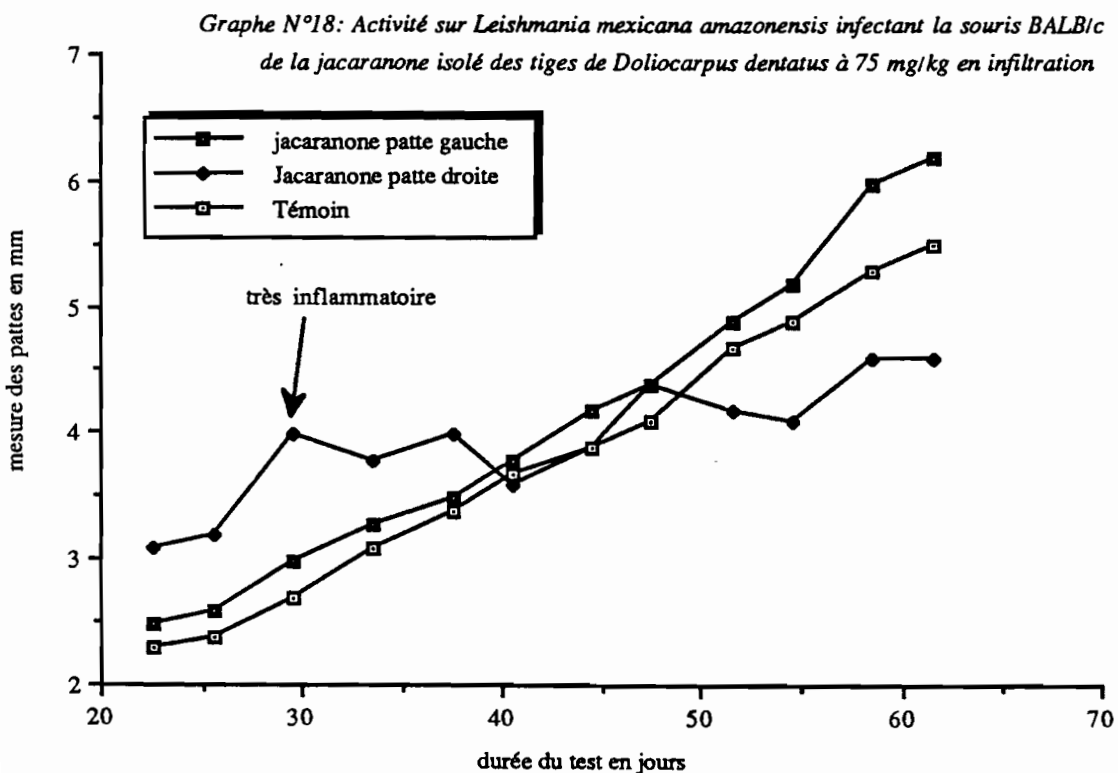
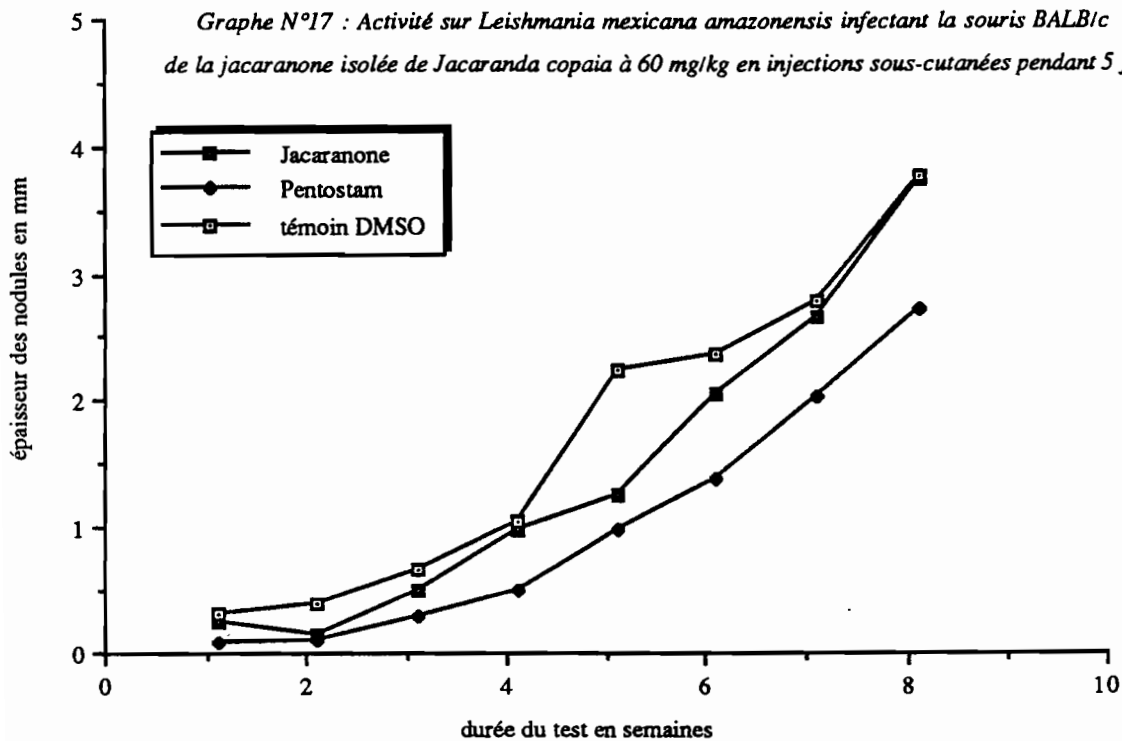
La jacaranone en mélange avec l'acide ursolique a montré *in vitro* une très forte cytotoxicité à la fois sur les macrophages et sur les promastigotes à la concentration de 4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (tableau N°38). Le test de la molécule purifiée a montré que cette activité n'est pas spécifiquement antileishmanienne.

Un essai de toxicité sur la souris a été effectué et montre que la DL 50 se situe entre 67  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  où toutes les souris survivent et 200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  où elles meurent toutes. Deux essais de l'activité antileishmanienne de la jacaranone ont été conduits *in vivo*. Le premier par la voie générale sous la forme d'injections sous-cutanées a montré une légère activité de ce produit pour la dose

Extraits testés	modèles expérimentaux	0.4	0.08	0.04	0.02	0.004	0.001	0.0005 mg/ml
		-----						
BIGNONIACEAE <i>Jacaranda copaia</i>  J.C. 6D mélange jacaranone+ac ursolique sol. = 40 mg/ml dans DMSO	A Promastig. survivants %		0	0	0	5	93	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %						98	85
		0	0	0	0	0	50	90
-----								
BIGNONIACEAE <i>Jacaranda copaia</i>  acide ursolique  sol. = 40 mg/ml dans DMSO	A Promastig. survivants %		71	80	100	100	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %			39	88	100	100	-
		0	98	97	98	100	98	95
-----								
		<b>0.004</b>	<b>0.002</b>			<b>0.001</b>	<b>0.0005</b>	
-----								
Promastig. BIGNONIACEAE <i>Jacaranda copaia</i>  Jacaranone  sol. = 40 mg/ml dans DMSO	A survivants %	67	72			98	100	
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %					85	100	
						98	98	
-----								
		<b>0.001</b>	<b>0.0005</b>			<b>0.00025</b>	<b>0.0001</b>	
-----								
BIGNONIACEAE <i>Jacaranda copaia</i>  Jacaranone  sol. = 40 mg/ml dans DMSO	A Promastig. survivants %							
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	80	100			100	100	
		98	98			98	98	

**Tableau N°38** : Activité des composés isolés de l' extrait chlorométhylénique des feuilles de *Jacaranda copaia* sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*  
modèle A = promastigotes en culture;  
modèle B = amastigotes infectant les macrophages de souris.

correspondant à sa DL50 sur cinq jours sur la souris (graphe N°17). Le second, par injection des produits en infiltration dans la patte infectée, montre une forte réaction inflammatoire et une forte toxicité cutanée qui vont masquer l'effet leishmanicide pendant la première partie de l'essai (graphe N°18). Ce composé est toutefois beaucoup trop toxique et peu spécifique pour envisager de l'utiliser comme antileishmanien en usage externe.

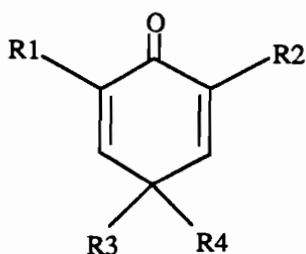


### 3.2.6.4. analogues structuraux de la jacaranone

#### 3.2.6.4.1. benzoquinones de synthèse

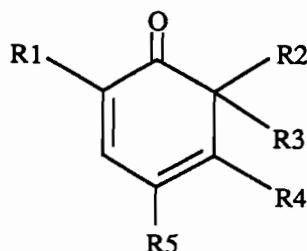
##### 3.2.6.4.1.1. activité antileishmanienne

L'activité intéressante de la jacaranone mais entachée de toxicité, nous a fait envisager de tester des composés voisins de cette hydroquinone. G. Kunesch <sup>194,195,196</sup> a synthétisé il y a une vingtaine d'années une série d'acétates de benzoquinones (59 à 65) qui n'ont pas fait l'objet de recherches d'activité biologique.



**59** R1 = CH<sub>3</sub>, R2 = CH<sub>3</sub>, R3 = CH<sub>3</sub>, R4 = OCOCH<sub>3</sub>

**60** R1 = H, R2 = H, R3 = CH<sub>3</sub>, R4 = OCOCH<sub>3</sub>



**61** R1 = H, R2 = CH<sub>3</sub>, R3 = OCOCH<sub>3</sub>, R4 = CH<sub>3</sub>, R5 = H

**62** R1 = C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, R2 = OCOCH<sub>3</sub>, R3 = OCOCH<sub>3</sub>, R4 = H, R5 = H

**63** R1 = H, R2 = OCOCH<sub>3</sub>, R3 = OCOCH<sub>3</sub>, R4 = H, R5 = CH<sub>3</sub>

**64** R1 = CH<sub>3</sub>, R2 = OCOCH<sub>3</sub>, R3 = OCOCH<sub>3</sub>, R4 = H, R5 = H

**65** R1 = CH<sub>3</sub>, R2 = OCOCH<sub>3</sub>, R3 = OCOCH<sub>3</sub>, R4 = H, R5 = CH<sub>3</sub>

Après vérification de leur stabilité par CCM et de leur identité par RMN du <sup>1</sup>H, certaines de ces molécules ont été testées sur les deux modèles promastigotes et amastigotes. Leur comportement *in vitro* est proche de celui de la jacaranone avec une forte cytotoxicité à la fois sur les promastigotes (tableau N°39) et sur les macrophages sans activité spécifique sur les amastigotes (tableau N°40). Cette toxicité est variable suivant la qualité des substituants du noyau aromatique : la présence de deux di-acétates en *ortho* de la fonction carbonyle de la

Composés	modèles expérimentaux	60 µg/ml	30 µg/ml	15 µg/ml
<b>62</b>	Amastig. intracell.	toxique	toxique	86
	I.S.			
<b>63</b>	Amastig. intracell.	toxique	toxique	toxique
	I.S.			
<b>64</b>	Amastig. intracell.	toxique	toxique	toxique
	I.S.			
		20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml
<b>62</b>	Amastig. intracell.	toxique I.S.	toxique	toxique
<b>63</b>	Amastig. intracell.	toxique	toxique	toxique
	I.S.			
<b>64</b>	Amastig. intracell.	toxique	toxique	toxique
	I.S.			
<b>65</b>	Amastig. intracell.	toxique	toxique	toxique
	I.S.			
		1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.25 µg/ml
<b>61</b>	Amastig. intracell.	105	105	102
	I.S.			
<b>62</b>	Amastig. intracell.	89	100	-
	I.S.			
<b>63</b>	Amastig. intracell.	88	94	75
	I.S.			
<b>64</b>	Amastig. intracell.	toxique	95	98
	I.S.			
<b>65</b>	Amastig. intracell.	77	89	92
	I.S.			
<b>59</b>	Amastig. intracell.	98	102	102
	I.S.			
<b>60</b>	Amastig. intracell.	95	102	97

**Tableau N°40** : essais de benzoquinones de synthèse, analogues de la jacaranone sur le modèle amastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* infectant des macrophages de souris *in vitro* au laboratoire de Parasitologie de Chatenay-Malabry.

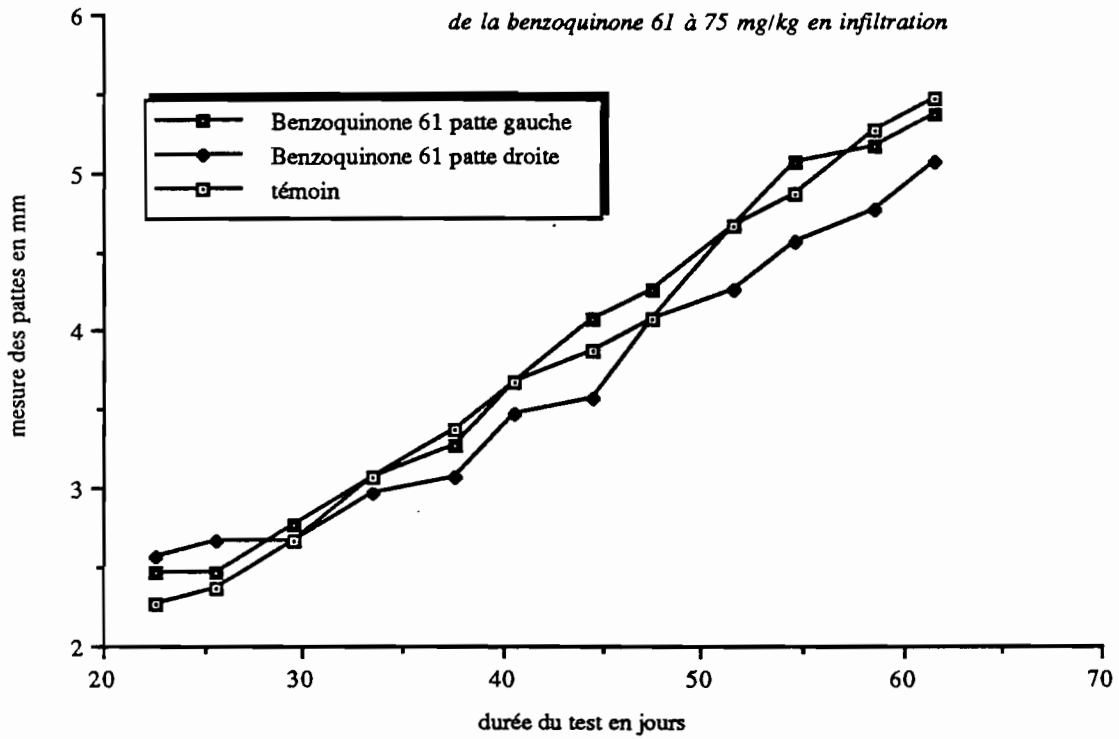
quinone semble renforcer l'activité, par contre le déplacement de leurs positions en *para* semble la diminuer.

Composés de référence	modèles expérimentaux	50 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml
59	Promastig. survivants %	0	14	17	34
60	Promastig. survivants %	0	10	17	95
61	Promastig. survivants %	0	55	89	96
62	Promastig. survivants %	0	7	12	63
63	Promastig. survivants %	0	0	5	70
64	Promastig. survivants %	0	0	0	62
65	Promastig. survivants %	0	0	0	63

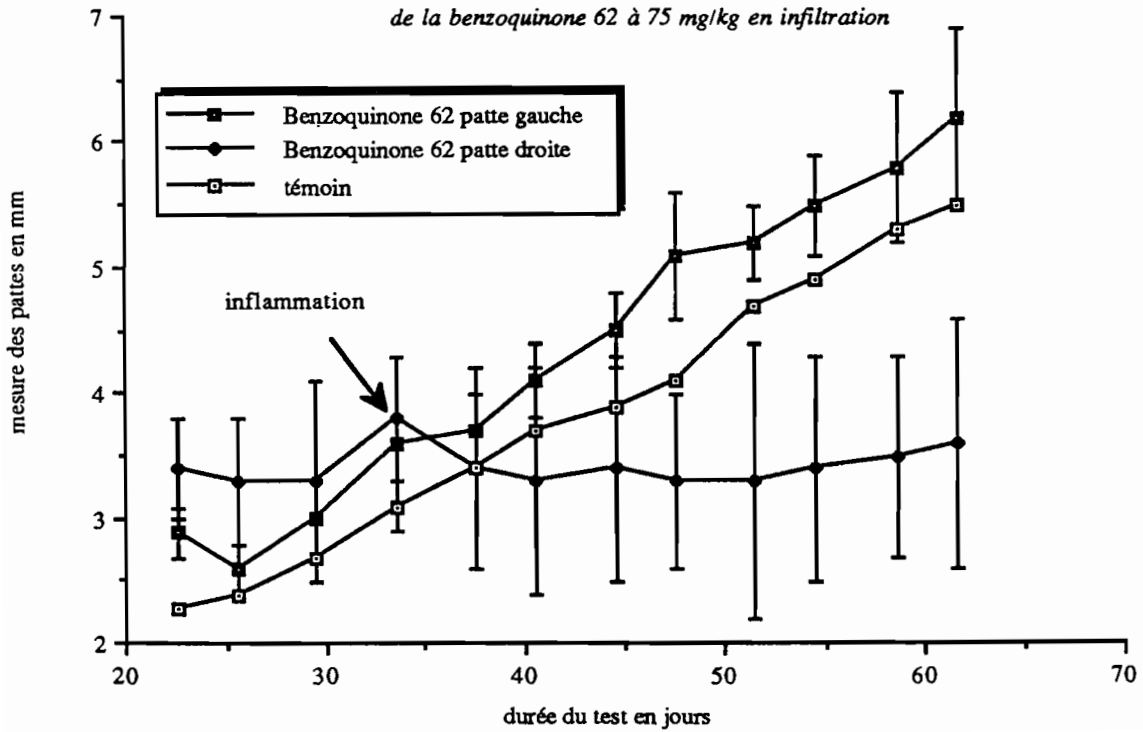
Tableau N°39 : Essais des benzoquinones de synthèse sur le modèle promastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis* en culture

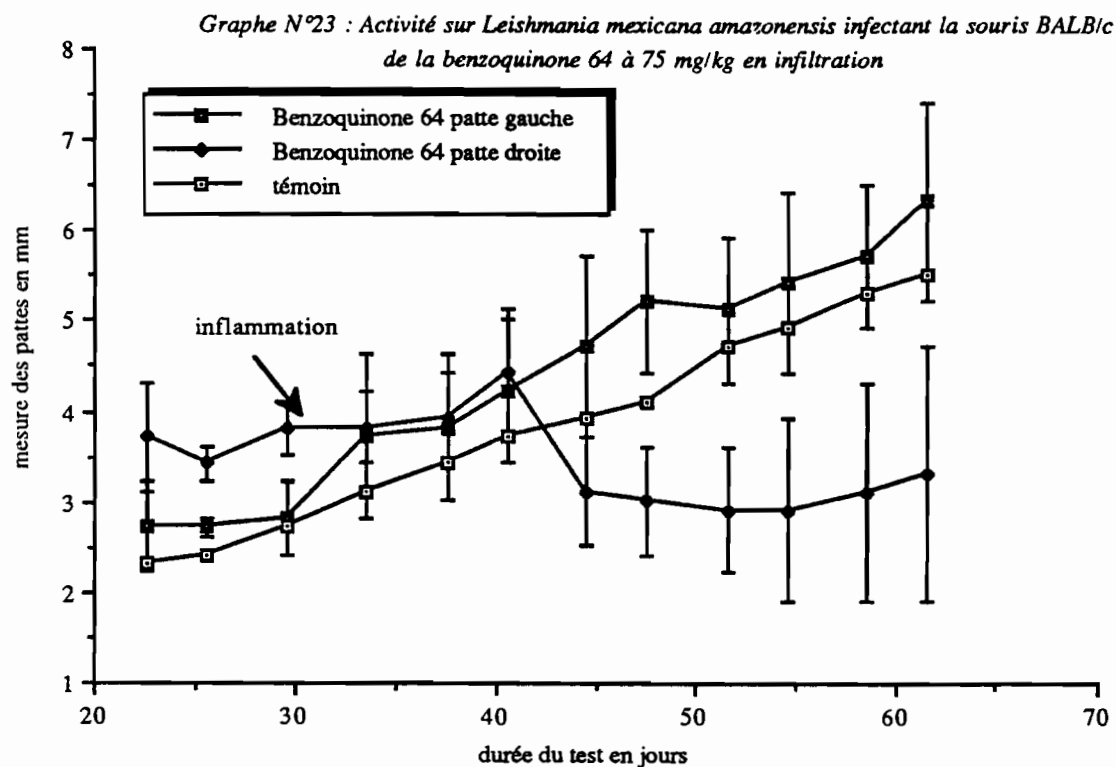
*In vivo*, malgré une forte dispersion des résultats, certaines de ces quinones (graphes N°19, 20, 21, 22, 23) montrent une activité comparable aux sels d'antimoine. Mais cette activité est entachée là aussi d'une forte toxicité cutanée qui est la caractéristique de nombreuses quinones. Des benzoquinones ont déjà fait l'objet d'études<sup>197,198</sup> de leurs activités trypanocides *in vitro* en montrant des activités intéressantes de type oxydant mais non confirmées *in vivo*. Les benzoquinones "vraies" diversement substituées sur les positions 1, 2, 3, 4 sont des inhibiteurs des systèmes respiratoires mitochondriaux faisant intervenir le coenzyme Q<sup>199</sup>, ce qui peut expliquer leurs effets cytotoxiques.

Grphe N°21 : Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de la benzoquinone 61 à 75 mg/kg en infiltration



Grphe N°22 : Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de la benzoquinone 62 à 75 mg/kg en infiltration





#### 3.2.6.4.1.2. activité cytotoxique sur cellules tumorales L1210

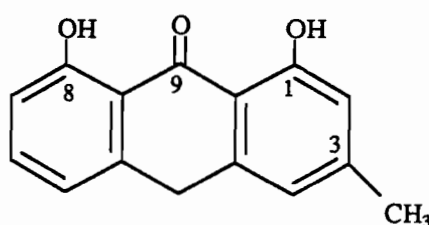
Par analogie avec l'activité antitumorale de la jacaranone démontrée par les américains, les benzoquinones de synthèse les plus représentatives de la série ont fait l'objet d'essai d'activité sur des cellules tumorales L1210 dans le laboratoire de Pharmacognosie du Professeur Koch à la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris V. Comme le montre le tableau N°41, les cinq benzoquinones montrent une activité assez importante sur ces cellules tumorales. Le schéma structure-activité proposé plus haut se trouve ainsi conforté.

Composés testés sur cellules L1210	Concentration inhibitrice 50 (en µg/ml)
<b>59</b>	9,5
<b>60</b>	0,75
<b>61</b>	7,5
<b>62</b>	2
<b>64</b>	0,5

Tableau N°41 : Activité cytotoxique des benzoquinones de synthèse sur les cellules tumorales L1210

### 3.2.6.4.2. La chrysarobine, mélange commercial d'antraquinones

Comme nous l'avons déjà indiqué plus haut la chrysarobine extraite de *Vataireopsis speciosa* a montré une certaine activité sur les promastigotes de leishmanies. Pour disposer d'une quantité suffisante de chrysarobine afin d'effectuer des tests *in vivo*, nous avons utilisé la chrysarobine commerciale de Sigma<sup>®</sup>, qui est un mélange de quinones extraite de *V. araroba* dont le composé majoritaire est l'antraquinone (66).



**66** Dihydro-1,8méthyl-3anthrone-9 qui constitue 30 % de la chrysarobine commerciale

L'activité *in vitro* de la chrysarobine est faible comme le montre le tableau N°42.

		en mg / ml	0.2	0.04	0.02	0.01	0.002	0.001	0.0005
PAPILIONACEAE	Promastig.								
	A survivants %			64	95	89	100	100	100
Chrysarobine	Amastig. intracell.				79	95	100	100	100
	B I.S. Macrophages survivants %		37	100	99	100	100	100	100

**Tableau N°42** : Activité de la chrysarobine SIGMA<sup>®</sup> sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis* *in vitro*

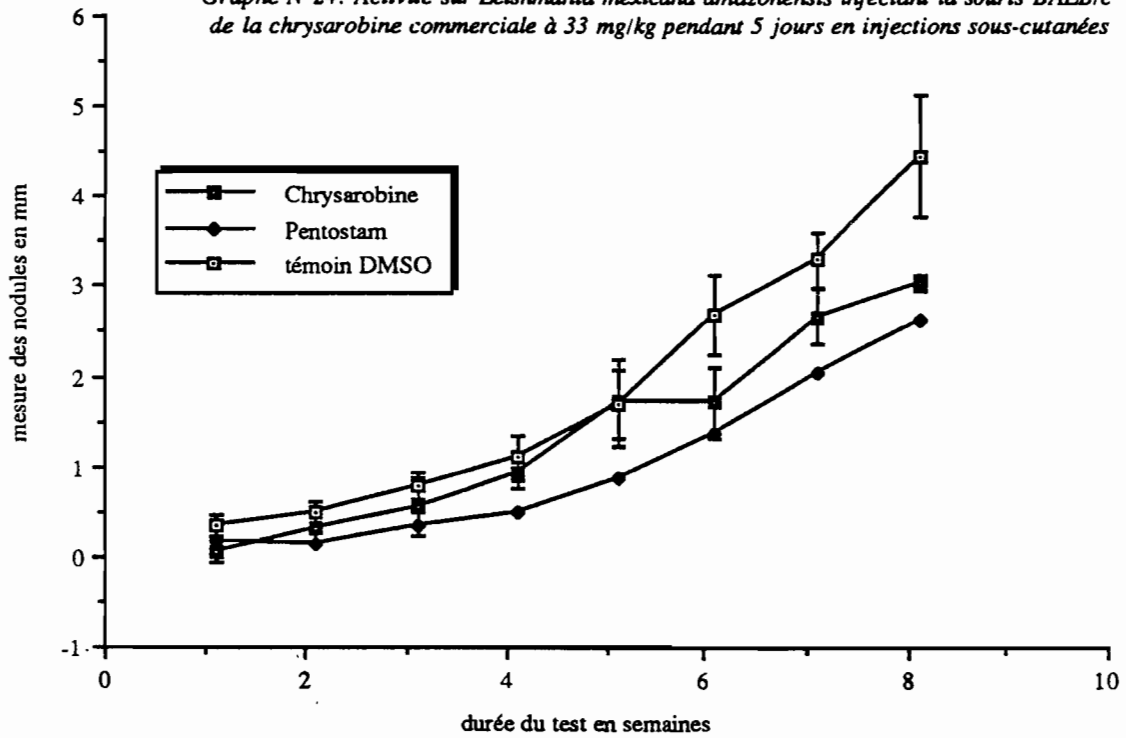
modèle A = promastigotes en culture;

modèle B = amastigotes infectant les macrophages de souris.

Son activité *in vivo* (graphe N°24) est plus intéressante quoiqu'entachée d'une certaine toxicité cutanée et plus lente par rapport à l'action des sels d'antimoine. Une intéressante activité *in vitro* de dérivés polyaminés d'antraquinones<sup>200</sup> a déjà été explorée sur les promastigotes de

différentes espèces de leishmanies mais n'a pas été confirmée *in vivo*.

Graphe N°24: Activité sur *Leishmania mexicana amazonensis* infectant la souris BALB/c de la chrysarobine commerciale à 33 mg/kg pendant 5 jours en injections sous-cutanées



## 4. CONCLUSION

Les travaux effectués ici ont été consacrés à la recherche de nouveaux principes actifs dans des plantes présumées antipaludiques et antileishmaniennes de la région amazonienne (plateau des Guyanes) dont certaines sont utilisées à ce titre en médecine locale.

Ils ont conduit à élaborer une méthodologie complète pour l'étude de ces plantes depuis la prospection ethnopharmacologique jusqu'à l'évaluation de l'activité antiparasitaire sur animaux de laboratoire, en passant par l'isolement et la détermination de structure de principes actifs mis en évidence.

Un inventaire préliminaire appuyé sur l'exploitation de l'herbier des plantes médicinales de l'ORSTOM à Cayenne et sur des enquêtes ethnobotaniques, en particulier celles que nous avons effectuées chez les Saramaka du Surinam a permis de sélectionner plus de cent-vingt plantes susceptibles de recéler des principes actifs antipaludiques et antileishmaniens. A ce stade, il nous a paru indispensable de définir des tests de triage permettant de retenir les plantes manifestant une activité dans ces domaines.

Pour l'activité antipaludique, nous avons retenu les formes sanguines de *Plasmodium falciparum* en culture cellulaire et le modèle expérimental de paludisme murin à *P. berghei yoelii*.

Pour l'activité antileishmanienne, nous avons montré que l'évaluation devait utiliser des tests *in vitro* sur des modèles proches de la pathologie humaine, c'est à dire les amastigotes d'une espèce très pathogène pour l'homme, *Leishmania mexicana amazonensis*, parallèlement à un test *in vivo* se rapprochant des conditions d'emplois de ces plantes par les populations en médecine traditionnelle, le modèle cutané en infiltration chez la souris. A l'aide des protocoles ainsi définis, quarante-trois plantes ont été retenues pour une activité antipaludique et huit pour une activité antileishmanienne, en vue d'un fractionnement de leurs constituants. Après contrôle de l'activité des fractions obtenues, quatre plantes non étudiées jusqu'ici du point de vue phytochimique ont été analysées en détail :

*Andira coriacea*, présumée antipaludique, qui contient des polyphénols dont un nouveau, le désméthyllaxiflorane et trois plantes présumées antileishmaniennes : *Faramea guianensis* qui a livré deux nouveaux flavanes ; *Jacaranda copaia* contenant de l'acide ursolique et un quinoïde, la jacaranone ; *Doliocarpus dentatus* dont nous avons isolé trois lignanes et trois triterpènes bétuliniques .

Une certaine activité antileishmanienne a été retrouvée avec l'acide ursolique et surtout la jacaranone. Ceci nous a conduit à nous intéresser à des composés de synthèse voisins de la jacaranone, des acétates de benzoquinones, qui se sont avérés avoir une activité plus intéressante sur la leishmaniose cutanée expérimentale de la souris à *Leishmania mexicana amazonensis*.

Notre travail, même confronté au caractère aléatoire d'une recherche des principes biologiquement actifs d'origine naturelle, montre le bien-fondé de cette démarche, notamment en ce qui concerne les plantes d'intérêt thérapeutique et en particulier les antileishmaniens dont nous sommes actuellement très dépourvus. Il montre également la nécessité à cet égard d'un protocole d'étude rigoureux et significatif tel que nous avons tenté de l'établir.

D'autre part, une projection vers des produits de synthèse de structure apparentée s'est avérée positive et une étude plus approfondie de l'activité cytotoxique de plusieurs des produits isolés devrait aboutir à la mise en évidence d'autres activités en relation avec la cytotoxicité.

## 5. PARTIE EXPERIMENTALE

## 5.1. CHIMIE

### 5.1.1. Appareillage

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un microscope KOFER et ne sont pas corrigés.

Les spectres ultra-violet (U.V.) ont été enregistrés en solution dans l'éthanol à 96°C, au moyen d'un appareil UNICAM SP 1800.

Les spectres infra-rouge (I.R.) ont été effectués dans des micropastilles de bromure de potassium ou en film sur pastilles de bromure de potassium, sur un spectrographe PERKIN-ELMER 257.

Les spectres de masse en impact électronique (I.E.) ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre NERMAG/SIDAR V 2.3 au S.A.M.M. du Centre d'Études Pharmaceutiques de Châtenay-Malabry et AEI MS-50 à l'ICSN (Gif/Yvette). L'intensité relative de chaque pic est indiquée entre parenthèses.

Les chromatographies sur couches minces ont été effectuées sur des plaques de gel de silice SCHLEICHER-SCHÜLL F 1500 LS 254. Ces plaques ont été observées en lumière U.V. à 254 et 366 nm et révélées soit à l'aide d'une solution de chlorure ferrique à 5% dans l'éthanol avec chauffage à 100-110°C, soit à l'aide d'une solution d'acide sulfurique à 20% avec chauffage à 100-110°C.

Les chromatographies "flash" (sur colonne) ont été réalisées avec de la silice de granulométrie 0,040-0,063 mm selon la technique de STILL et al <sup>152</sup>.

Les chromatographies préparatives en phase liquide à haute performance (C.L.H.P.) ont été réalisées à l'aide d'un appareil WATERS 500 sur silice de type 60 (granulométrie : 0,010-0,040 mm) sous une pression de 10 bars.

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire du proton (R.M.N. 1H) ont été tracés sur des appareils BRUKER AM 200 SY dans le service de R.M.N. du Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires du Collège de France à Paris, BRUKER AM 250 dans le service de R.M.N. de l'ICMO, Faculté des Sciences de Paris XI (Orsay) ou BRUKER AM 300 dans le service de R.M.N. du LASIR, Centre de Recherche du CNRS de Thiais. Le solvant deutérié utilisé est précisé entre parenthèses. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par

rapport au tétraméthylsilane (TMS,  $d = 0$ ). Les constantes de couplage (J) sont indiquées en Hertz (Hz). Les abréviations suivantes sont employées : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet dédoublé), td (triplet dédoublé), tt (triplet de triplet), m (multiplet). Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13 (R.M.N.  $^{13}\text{C}$ ) ont été enregistrés sur un appareil BRUKER AM 200 opérant à 50,3 MHz, dans le service de R.M.N. du Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires du Collège de France. Les déplacements chimiques ( $d$ ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS,  $d = 0$ ). Le solvant deutérié utilisé est indiqué entre parenthèses. La parité des carbones a été déterminée par une expérience de "J-modulated spin-echo".

### **5.1.2. Préparation des extraits pour le criblage préliminaire**

#### **\* Paludisme**

20 g de poudre végétale sont classiquement percolés par une certaine quantité d'éthanol à 70°C. La poudre est épuisée lentement jusqu'à ce que l'extrait ne présente plus de coloration (300 à 500 ml d'éthanol).

#### **\* Leishmaniose**

20 g de drogue pulvérisée sont placés dans un ballon avec de l'eau distillée (200 à 400 ml). Le tout est porté à ébullition sous reflux pendant 5 mn et laissé infuser 1 h. Après quoi, on filtre sous vide et le filtrat est lyophilisé.

### 5.1.3. *Andira coriacea*

#### 5.1.3.1. chimie extractive sur la drogue végétale

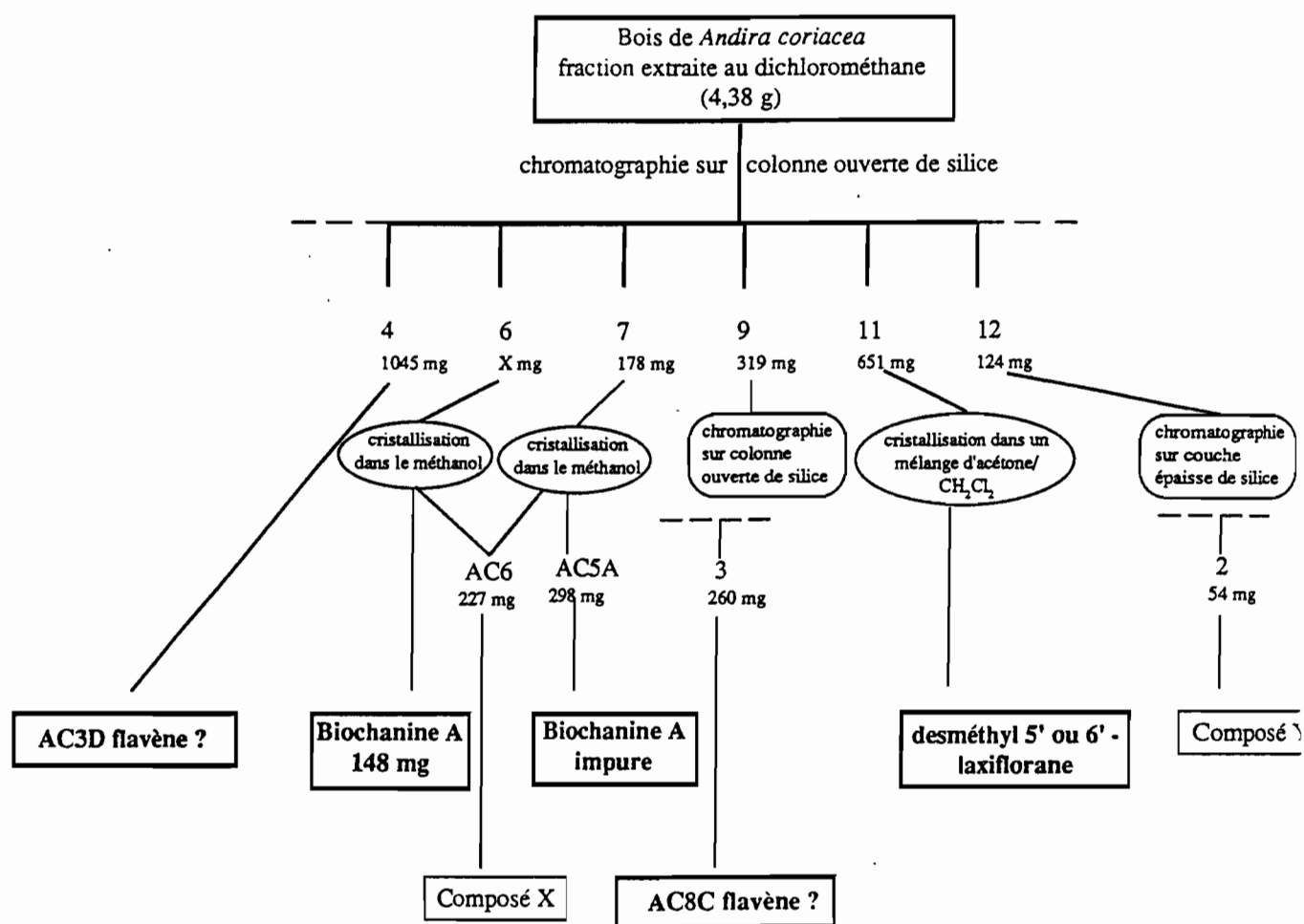
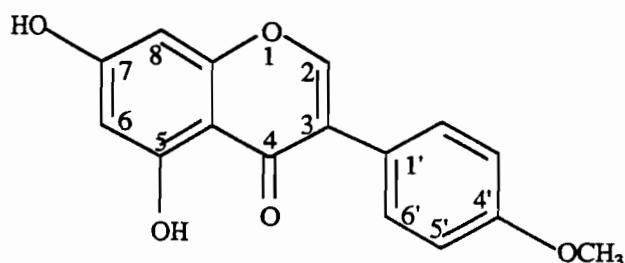


Schéma N°5 : isolement des principes actifs du bois de tronc de *Andira coriacea*

### 5.1.3.2. données physico-chimiques des molécules isolées

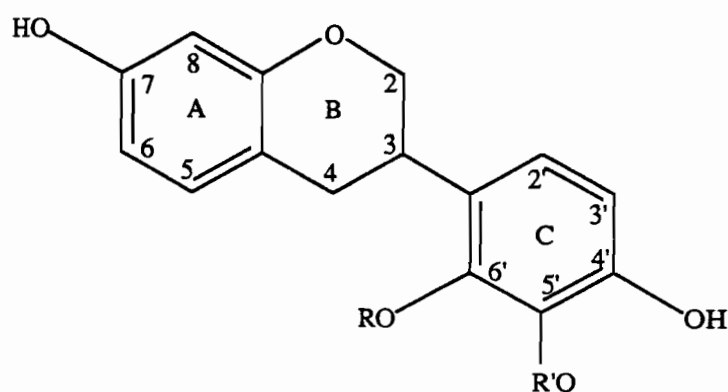
#### Biochanine A (45)



**45** Biochanine-A

- Cristaux jaunes
- Point de fusion : 220-223°C
- Spectre I.R. (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  en cm<sup>-1</sup>: 3290 (HO), 1645 (C=O conjugué), 1620, 1605, 825 (bandes aromatiques).
- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 284 (100), 283 (21), 269 (13), 153 (2), 152 (16), 132 (44), 124 (10).
- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (CDCl<sub>3</sub> + DMSOD<sub>6</sub>) :

	$\delta$ ppm		J <sub>HH</sub> (Hz)	nombre de protons
CH <sub>3</sub> O - 4'	3,75	s		3
H - 6	6,15	d	2	1
H - 8	6,28	d	2	1
H - 3' et H - 5'	6,87	d	9	2
H - 2' et H - 6'	7,38	d	9	2
H - 2	8,03	s		1
OH - 7	8,95	s(élargi)		1

Désméthyllaxiflorane (46)

**46** Désméthyllaxiflorane R = H ou CH<sub>3</sub>  
R' = CH<sub>3</sub> ou H

- amorphe

- Spectre UV  $\lambda$  max nm (log  $\epsilon$ ) : 226 (4,48), 268 (épaulement), 280 (3,41)

- Spectre I.R. (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  en cm<sup>-1</sup>: 3300(OH), 1620, 1600, 835 (bandes aromatiques).

- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 288 (59), 167 (11), 166 (100), 154 (52), 153 (45), 133 (27), 123 (77)

- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (DMSOD<sub>6</sub>) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
H - 4	2,73	dd	15 ; 4,5	1
H - 4	2,87	td	15 ; 4,5	1
CH <sub>3</sub> O	3,73	s		3
H - 3	3,78	m		1
H - 2	3,88	t	10	1
H - 2	4,12	d	10	1
H - 8	6,16	d	2,5	1
H - 6	6,26	dd	8 ; 2,5	1
H - 2'	6,40	d	8,5	1
H - 3'	6,50	d	8,5	1
H - 5	6,85	d	8	1
HO -	8,55	s(élargi)		2
HO -	9,15	s(élargi)		1

AC3D (47)

- amorphe
- Spectre UV  $\lambda$  max nm : 226, 282 (épaulement), 288.
- Spectre I.R. (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  en cm<sup>-1</sup>: 3380(HO), 1620, 1590, 820(bandes aromatiques).
- Spectre de masse I.E. m/z (abondance %): 270 (100), 269 (46), 255 (30), 197 (7), 148 (20)
- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (CDCl<sub>3</sub>) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
<u>H</u> O -	1,71	s(élargi)		1
H -	3,53	m		2
<u>CH</u> 3 -	3,77	s		3
<u>H</u> O -	5,22	s(élargi)		1
H -	5,50	d	6	1
H - arom	6,43	dd	9 ; 2,5	1
H - arom	6,44	d	2,5	1
H - arom	6,46	d	2,5	1
H - arom	6,54	dd	9 ; 2,5	1
H - arom	7,13	d	9	1
H - arom	7,39	d	9	1

AC8C (48)

- amorphe

- Spectre UV  $\lambda$  max nm : 220, 280 (épaulement), 287, 302, 336 (épaulement).

- Spectre I.R. (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  en cm<sup>-1</sup>: 3300(HO), 1615, 835(bandes aromatiques).

- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 286 (100), 271(39) M - CH<sub>3</sub>, 225 (10), 197 (20), 150 (40), 147 (41).

- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (CDCl<sub>3</sub>) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
H	3,82	m		2
CH <sub>3</sub> O	3,84	s		3
H	5,45	d	7,5	1
H - arom	6,41	d	2,5	1
H - arom	6,48	s		1
H - arom	6,57	dd	9 ; 2,5	1
H - arom	6,84	s		1
H - arom	7,35	d	9	1

### 5.1.4. *Faramea guianensis*

#### 5.1.4.1. chimie extractive sur la drogue végétale

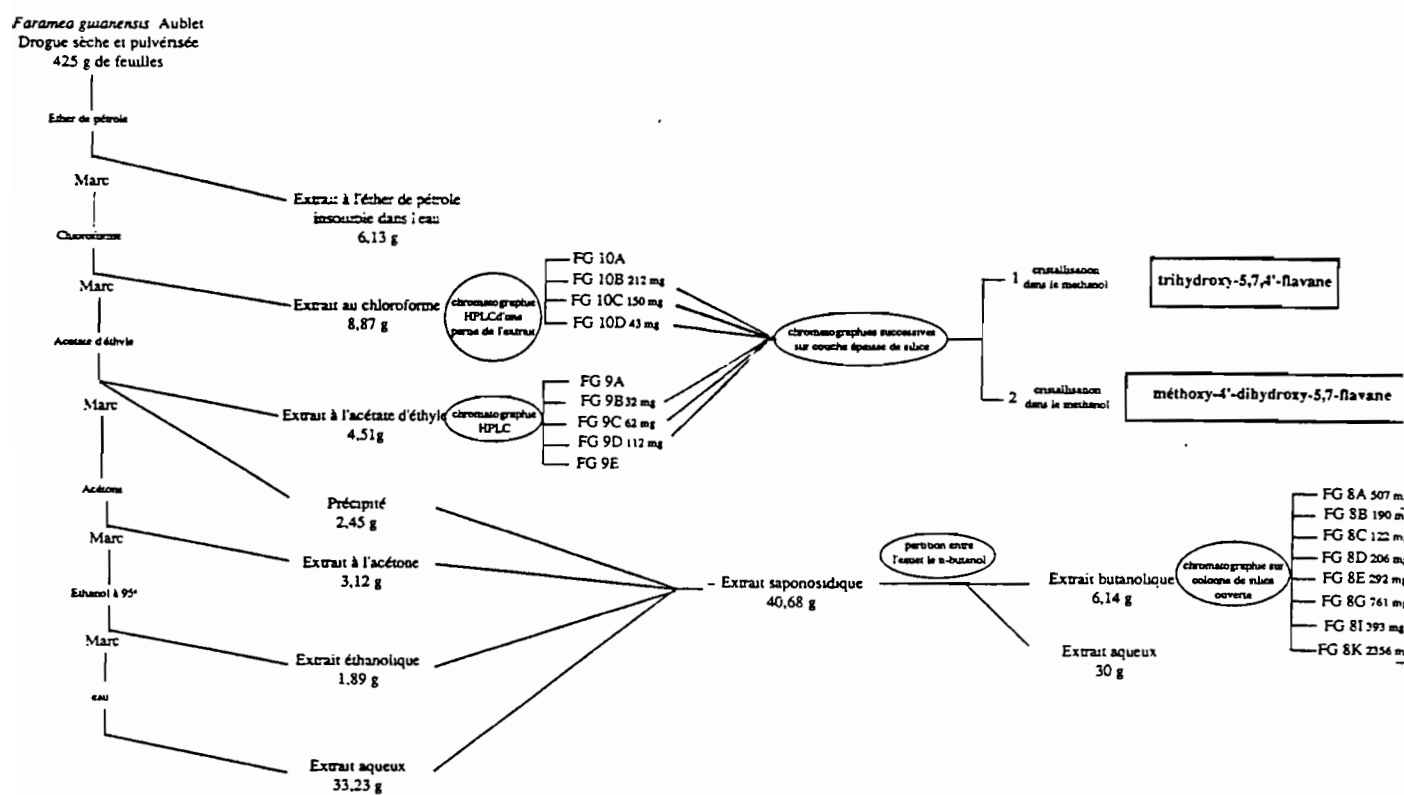
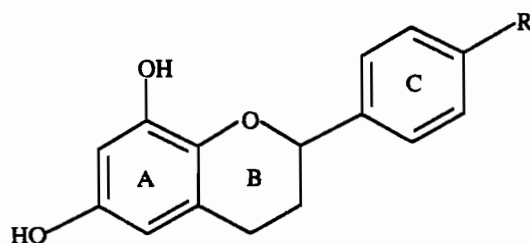


Schéma N°8 : isolement des principes actifs des feuilles de *Faramea guianensis*

### 5.1.4.2. données physico-chimiques des molécules isolées

#### trihydroxy-5,7,4' flavane (49)



**49** R = OH trihydroxy-5,7,4' flavane

**50** R = OCH<sub>3</sub> méthoxy 4', 5,7 flavane

- cristaux blancs

- point de fusion : 208-211°C

- Spectre UV  $\lambda$  max nm (log  $\epsilon$ ) : 214 (3,74), 226 (épaulement), 274 (2,58) ; déplacement bathochrome de 20 nm en milieu basique.

- Spectre I.R. (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  en cm<sup>-1</sup>: 3390(HO), 1615, 1605, 825-810(bandes aromatiques).

- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 258 (88) , 139 (100), 133 (38), 121 (38), 120 (>100), 107 (35).

- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (CDCl<sub>3</sub>) :

	$\delta$ ppm		J <sub>HH</sub> (Hz)	nombre de protons
H - 3	1,83	m		1
H - 3	2,00	m		1
H - 4	2,52	m		2
H - 2	4,18	dd	12,5 ; 2,5	1
H - 6	5,67	d	2,5	1
H - 8	5,81	d	2,5	1
H - 2' et H - 6'	6,68	d	9	2
H - 3' et H - 5'	7,12	d	9	2

- Spectre de R.M.N. du <sup>13</sup>C, 50,3 MHz (CD<sub>3</sub>OD) :

C : 158,0 (C-7?), 157,9 (C-9?), 157,4 (C-5?), 157,3(C-4'?) ,134,3 (C-10), 102,5 (C-1'),

CH : 128,5 (C-3' et C-5'), 116,0 (C-2' et C-6'), 96,0 (C-8), 95,9 (C-6), 78,8 (C-2)

CH<sub>2</sub> : 30,9 (C-4), 20,5 (C-3)

trihydroxy-5,7,4'flavane de synthèse

- cristaux blancs

- point de fusion : 210-213°C

- Spectre de R.M.N. du  $^1\text{H}$  à 200 MHz ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
H - 3	1,92	m		1
H - 3	2,08	m		1
H - 4	2,64	m		2
H - 2	4,85	dd	12,5 ; 2,5	1
H - 6	5,67	d	2,5	1
H - 8	5,85	d	2,5	1
H - 2' et H - 6'	6,76	d	9	2
H - 3' et H - 5'	7,21	d	9	2

dihydroxy-5,7-méthoxy-4'flavane (50)

- cristaux blancs

- Point de fusion : 193-196°C

- Spectre UV  $\lambda$  max nm (log  $\epsilon$ ): 215 (épaulement), 224 (3,94), 274 (2,69), 280 (épaulement).

- Spectre I.R. (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  en cm<sup>-1</sup>: 3380(HO), 1630, 1615, 805(bandes aromatiques).

- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 272 (33), 147 (17), 134 (89), 121 (26), 105 (58), 91(100).

- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (CDCl<sub>3</sub>) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
H - 3	1,96	m		1
H - 3	2,10	m		1
H - 4	2,62	m		2
O-CH <sub>3</sub>	3,75	s		3
H - 2	4,87	dd	12,5 ; 2,5	1
H - 6	5,90	d	2,5	1
H - 8	5,95	d	2,5	1
H - 2' et H - 6'	6,83	d	9	2
H - 3' et H - 5'	7,26	d	9	2

- Spectre de R.M.N. du <sup>13</sup>C, 50,3 MHz (CD<sub>3</sub>OD) :

C : 160,6 (C-4'), 157,9 (C-9?), 157,4 (C-5?), 157,3(C-7?) ,135,4 (C-10), 102,5 (C-1'),

CH : 128,4 (C-3' et C-5'), 114,7 (C-2' et C-6'), 96,0 (C-8), 95,9 (C-6), 78,6 (C-2)

CH<sub>2</sub> : 30,8 (C-4), 20,4 (C-3)

CH<sub>3</sub> : 55,7

### 5.1.5. *Doliocarpus dentatus*

#### 5.1.5.1. chimie extractive sur la drogue végétale

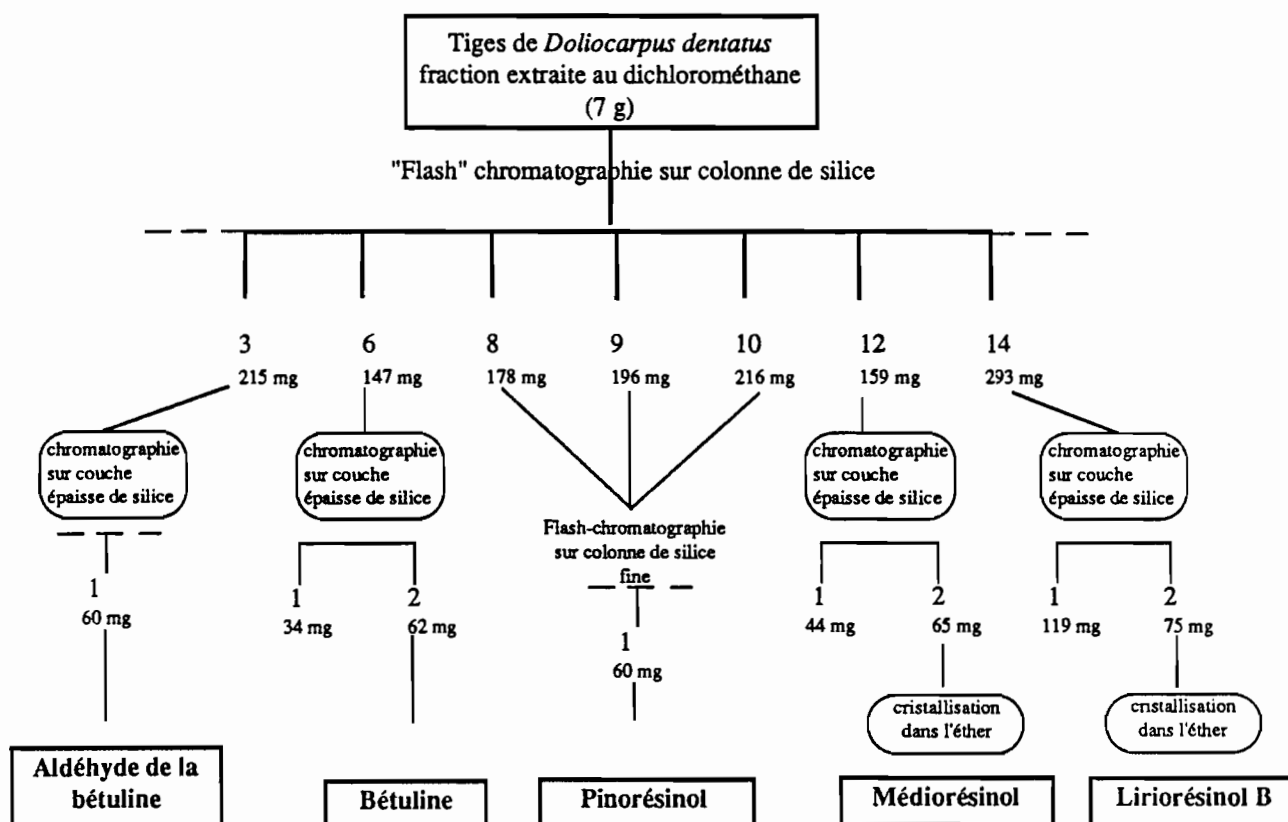
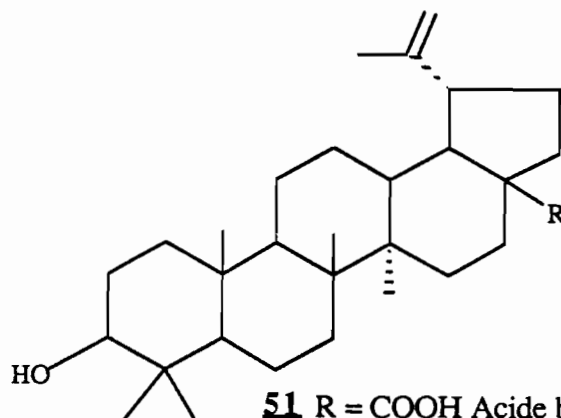


Schéma N°10 : isolement des principes actifs des tiges de *Doliocarpus dentatus*

### 5.1.5.2. données physico-chimiques des molécules isolées

#### Acide bétulinique (51)



**51** R = COOH Acide bétulinique

**52** R = CH<sub>2</sub>OH Bétuline

**53** R = CHO Aldéhyde de la bétuline

- cristaux blancs

- Point de fusion : 275-278°C

- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 457 (2)M-1, 220 (17), 207 (41), 189 (87)

- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (DMSOD<sub>6</sub>) :

	δ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
C- 29	1,66	s		3
C - 30	4,60	d	24	2

- Spectre de R.M.N. du <sup>13</sup>C, 50,3 MHz (DMSOD<sub>6</sub>) :

C : 36,3 (C10) ; 38,3 (C4) ; 42,5 (C14) ; 55,4 (C17) ; 76,8 (C3) ; 150,3 (C20) ; 177,2 (C28)

CH : 37,6 (C13) ; 48,6 (C18) ; 48,6 (C19) ; 50 (C9) ; 54,9 (C5)

CH<sub>2</sub> : 18,6 (C6) ; 20,5 (C11) ; 25,1 (C12) ; 27,1(C2) ; 28,1 (C21) ; 30,1 (C15) ; 31,7 (C16) ;  
33,9 (C7) ; 36,7 (C22) ; 38,5 (C1) ; 109,6 (C30)

CH<sub>3</sub> : 14,4 (C27) ; 15,7 (C24) ; 15,9 (C25) ; 15,9 (C26) ; 18,9 (C29) ; 29,2 (C23)

Bétuline (52)

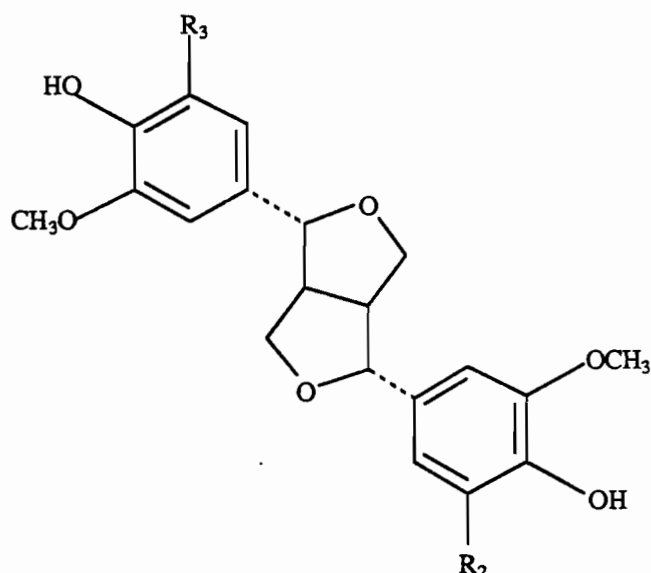
- amorphe
- Spectre I.R. (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  en cm<sup>-1</sup>: 3520 HO, 2930, 1605.
- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 442 (38), 411 (72) M - CH<sub>2</sub>OH, 207 (76), 189 (100).
- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (CDCl<sub>3</sub>) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
C- 29	1,72	s		3
C - 30	4,62	d	24	2

Aldéhyde de la bétuline (53)

- amorphe
- Spectre UV  $\lambda$  max nm : 208 , 222 (épaulement), 264.
- Spectre I.R. (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  en cm<sup>-1</sup>: 3520, 2930, 1605(CO).
- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 440 (13), 411 (10) M - CHO, 207 (56), 189 (47).
- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (CDCl<sub>3</sub>) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
C- 29	1,69	s		3
C - 30	4,70	d	24	2
C - 28	9,68	s		1

Liriorésinol B (54)

**54** R1 et R2 = CH<sub>3</sub>O Syringarésinol ou liriorésinol B

**55** R1 = H et R2 = CH<sub>3</sub>O Médiorésinol

**56** R1 et R2 = H Pinorésinol

- cristaux blancs

- Point de fusion : 162-166°C

- Spectre I.R. (KBr)  $\nu$  en cm<sup>-1</sup>: 3520 (HO), 1615 (bandes aromatiques), 1110 (C-O).

- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 418 (85), 388 (23), 358 (23), 235 (11), 193

(19)[Ar-CH-CH=CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 181 (42) Ar-CO<sup>+</sup>, 167 (29) Ar-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>, 164 (35), 151 (63), 131 (31).

- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (CDCl<sub>3</sub>) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
H - 1 et H - 5	3,11	m		2
H - 8 ou H - 4	3,71	m		2
H - 4 ou H - 8	3,73	m		2
CH <sub>3</sub> O	3,94	s(élargi)		12
H - 4 ou H - 8	4,24	m		2
H - 2 et H - 6	4,76	d	4	2
H O - 4' et HO -4"	5,52	s(élargi)		2
H aromatiques	6,55	s(élargi)		4

Médiorésinol (55)

- cristaux blancs
- Point de fusion : 167-170°C
- Spectre I.R. (KBr)  $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$ : 3530 HO, 1610(bandes aromatiques), 1110 (C-O).
- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 388 (100), 344 (46), 181 (42)  $\text{Ar}_2\text{-CO}^+$ , 167 (28)  $\text{Ar}_2\text{-CH}_2^+$ , 151 (81)  $\text{Ar}_1\text{-CO}^+$ , 137 (28)  $\text{Ar}_2\text{-CH}_1^+$ , 131 (40).
- Spectre de R.M.N. du  $^1\text{H}$  à 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
H - 1 et H - 5	3,11	m		2
H - 8 ou H - 4	3,71	m		2
$\text{CH}_3\text{O}$	3,89	s(élargi)		9
H - 4 ou H - 8	4,24	m		2
H - 2 et H - 6	4,72	m		2
$\underline{\text{H}}\text{O} - 4'$	5,52	s(élargi)		1
$\underline{\text{H}}\text{O} - 4''$	5,62	s(élargi)		1
H - 2'' et H - 6''	6,57	s		2
H - 2'	6,80	m		1
H - 5'	6,85	m		1
H - 6'	6,95	m		1

Pinorésinol (56)

- amorphe

- Spectre I.R. (KBr)  $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$ : 3530 (HO), 1110(C-O)

- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 358 (48), 280 (19), 205 (11), 163 (25) [Ar-CH-CH=CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 151 (100) Ar-CO<sup>+</sup>, 137 (61) Ar-CH<sub>2</sub><sup>+</sup>.

- Spectre de R.M.N. du <sup>1</sup>H à 200 MHz (CDCl<sub>3</sub>) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
H - 1 et H - 5	3,11	m		2
H - 8 ou H - 4	3,85	dd	8 ; 4	2
<u>CH</u> 3	3,91	s		6
H - 4 ou H - 8	4,25	m		2
H - 2 et H - 6	4,75	d	4	2
<u>H</u> O	5,63	s(élargi)		2
H - 2' et H - 2''?	6,90	d	2,5	2
H - 6' et H - 6''?	6,88	d	4	2
H - 5' et H - 5''?	6,84	d	10	2

### 5.1.6. *Jacaranda copaia*

#### 5.1.6.1. chimie extractive sur la drogue végétale

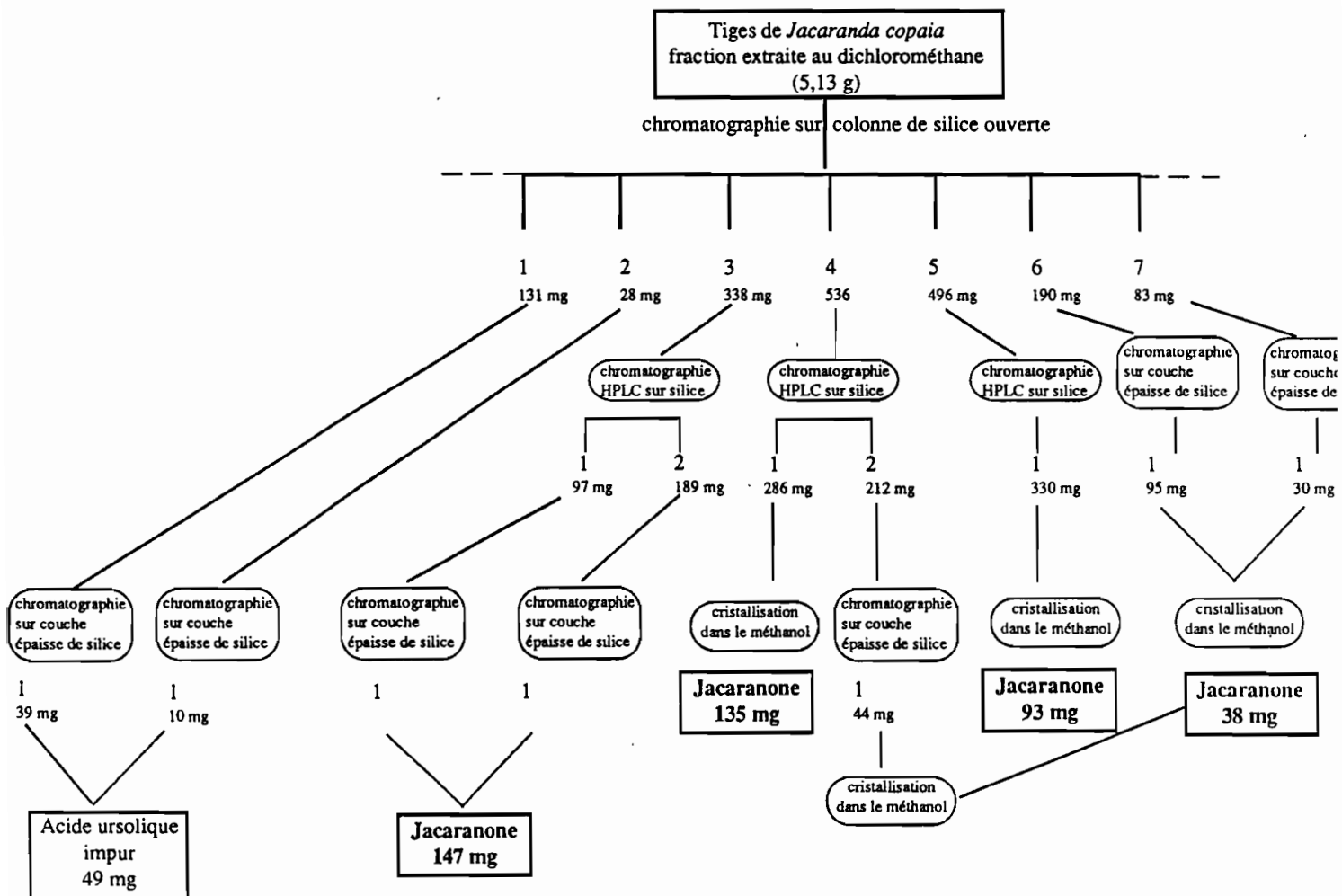
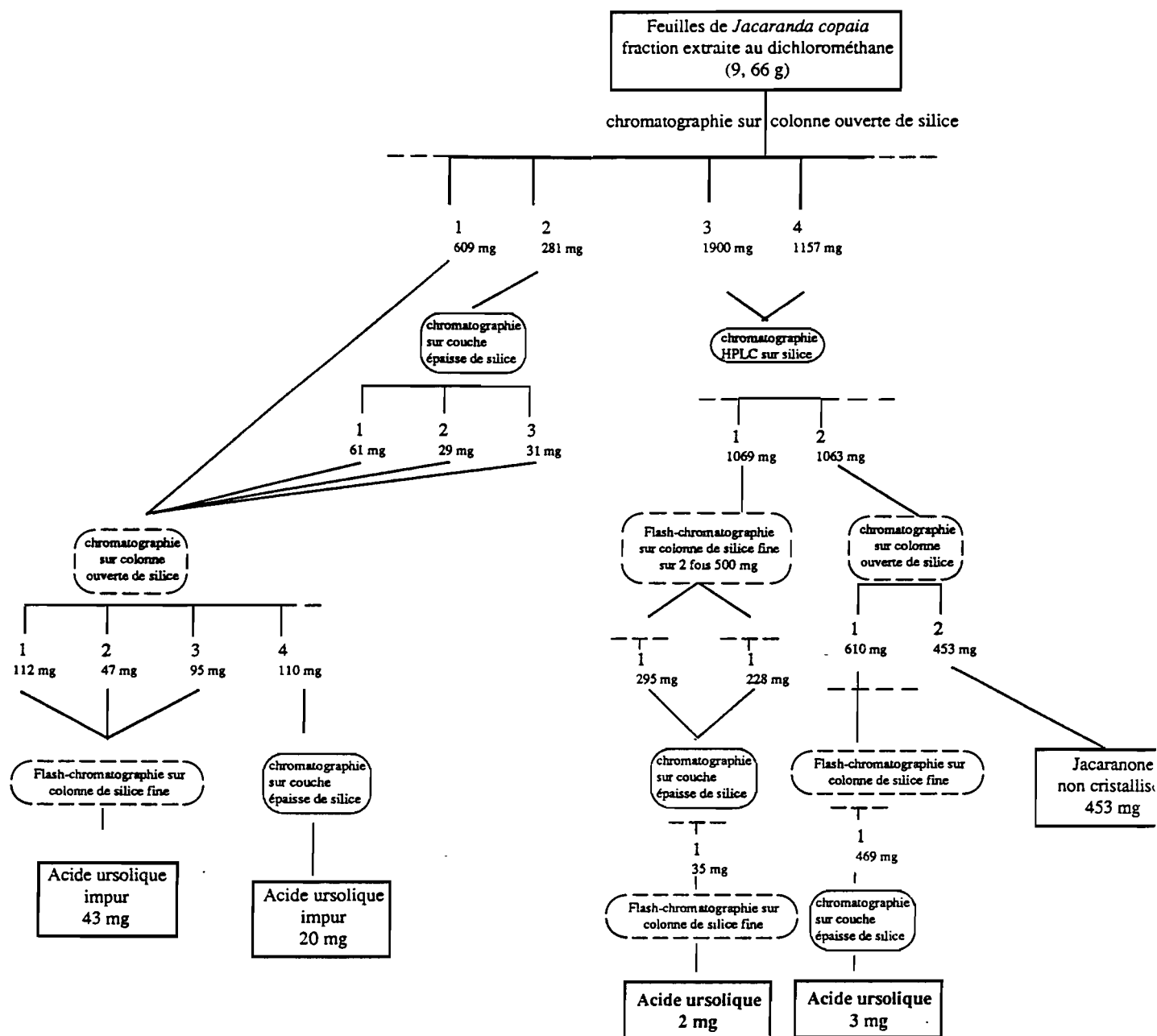
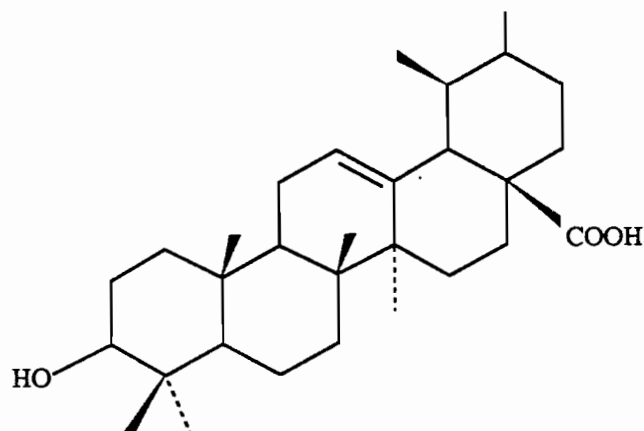


Schéma N°14 : isolement des principes actifs des tiges de *Jacaranda copaia*

Schéma N°15 : isolement des principes actifs des feuilles de *Jacaranda copaia*

### 5.1.6.2. données physico-chimiques des molécules isolées

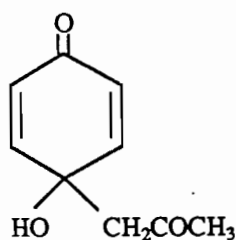
#### Acide ursolique (57)



**57** Acide ursolique

- amorphe
- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %) : 456 (2,6%); 248 (100%) ; 207 (26%) ; 203 (66%) ; 133 (34%)
- Spectre I.R. (KBr)  $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$  : 3420 ; 2920 ; 1070.

#### Jacaranone (58)



**58** Jacaranone

- cristaux jaunes
- Point de fusion : 74-79°C
- Spectre I.R. (KBr)  $\nu$  en  $\text{cm}^{-1}$ : 3380 (OH), 1715(C=O ester ), 1665(C=O conjugué), 1625, 865 (bandes aromatiques).
- Spectre de masse I.E.m/z (abondance %): 182 (5%) ; 150 (25%) ; 122 (22%); 109 (100%) ; 81 (23%) ; 74 (71%).

- Spectre de R.M.N. du  $^1\text{H}$  à 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) :

	$\delta$ ppm		J HH(Hz)	nombre de protons
$\text{CH}_2\text{CO}$	2,71	s		2H
$\text{OCH}_3$	3,77	s		3H
$\text{HO} - 1$	3,95	s (large)		1H
H - 3 et H - 5	6,21	d	9hz	2H
H - 2 et H - 6	6,96	d	9hz	2H

## 5.2. BIOLOGIE

### 5.2.1. Tests réalisés à l'Institut Pasteur de Cayenne

#### 5.2.1.1. Paludisme

##### 5.2.1.1.1. *in vitro* <sup>201</sup>

##### 5.2.1.1.1.1. Les parasites

Il s'agit d'une souche de référence obtenue de Wilson (Londre), la souche chloroquino-sensible "Ouganda Palo Alto" (souche FUP) qui a été adaptée tout d'abord sur le singe écureuil (*Saimiri sciureus*), sans perdre de son potentiel infectant pour les globules rouges humains<sup>202</sup>. Cette souche, maintenue en permanence sur des *Saimiri* splénectomisés, a été cultivée sur des érythrocytes humains A<sup>+</sup> frais.

##### 5.2.1.1.1.2. Les réactifs et milieux

\* Le milieu RPMI 1640 (SIGMA) est reconstitué de la manière suivante :

10,4g de RPMI (prépesés par le fabricant), 2,1g de bicarbonate de sodium, 2,0g de glucose, 8,3g d'HEPES (SIGMA) qui permet de maintenir le milieu à un pH de 6,9 à 7,1, 10 mg de gentamicine (UNICET), de l'eau distillée (BIOSEDRA) qsp 1000 ml. Le milieu est stérilisé par filtration sur des membranes millipores de 0,22  $\mu\text{m}$ , distribué en flacons de 200 ml puis conservé au congélateur à -20°C pendant plusieurs mois.

\* Sérum humain

Le sérum A<sup>+</sup> de donneurs humains est utilisé de préférence. La réalisation d'un mélange de plusieurs sérums permet d'obtenir des taux de multiplications reproductibles d'une manipulation à l'autre. Le sérum est clarifié par centrifugation puis par filtrations successives à 0,8  $\mu\text{m}$  et 0,45  $\mu\text{m}$ . Le sérum est ensuite stérilisé par filtration à 0,22  $\mu\text{m}$ . Il est distribué en tubes de 50 ml puis conservé au congélateur à 20°C pendant plusieurs mois.

\* RPMI+sérum humain

Le RPMI est supplémenté avec 10 % de sérum. Il est stérilisé une nouvelle fois par filtration à 0,22  $\mu\text{m}$  puis conservé en flacons de 200 ml à -20 °C.

\* Erythrocytes humains du groupe A<sup>+</sup>

Le sang est prélevé sur citrates (ACD), puis centrifugé à 1800t/mn pendant 10 mn. Le plasma est éliminé et le culot lavé deux fois avec du RPMI. Le culot du dernier lavage est repris avec un volume équivalent de RPMI+ sérum humain. Les hématies sont conservés à +4 °C pendant 10 jours au maximum.

#### 5.2.1.1.1.3. Culture

##### \* Dilution de la culture mère

100 µl de la culture mère sont prélevés. Après centrifugation, un frottis est réalisé sur le culot. Ce frottis est fixé au méthanol puis coloré au Giemsa à 10%(RAL). La parasitémie est déterminée. Le culot parasité est ainsi dilué avec des globules rouges de manière à amener le mélange à une parasitémie comprise entre 0,2 et 1,0 %. Le mélange est lavé deux fois avec du RPMI avant la mise en culture.

##### \* Mise en culture

La quantité de culot globulaire parasité nécessaire est dilué avec le RPMI+sérum humain pour réaliser un hématoците de 5 à 10 %. Le mélange est introduit stérilement dans des boites de Pétri qui sont placées dans une étuve à 37 °C en atmosphère contrôlée en O<sub>2</sub> ( composition du mélange 5 % d'O<sub>2</sub>, 5 % de CO<sub>2</sub>, 90 % d'N<sub>2</sub>).

##### \* Entretien des cultures

La parasitémie est suivie quotidiennement par la réalisation de frottis. Le liquide nutritif est remplacé quotidiennement par du milieu frais préalablement équilibré à 37 °C. Les cultures sont diluées tous les 3 ou 4 jours par addition d'hématies fraîches.

#### 5.2.1.1.1.4. Test d'activité

Le milieu de culture est distribué dans des cupules à raison de 0.5 ml par cupule. Puis, on met les extraits de plantes à raison de 100 µg par ml de milieu. On ajoute dans chaque cupule 50 µl d'une suspension parasitaire de 96 heures, obtenue par mélange de globules rouges en suspension dans le RPMI et d'érythrocytes infectés pour obtenir un niveau initial de parasitémie de 0.50 à 1%. Les cupules sont mises à incuber à 37 °C sous le mélange gazeux précédant. Des frottis colorés sont préparés à 0 h et 96 h. Des témoins milieu et solvant sont

préparés en parallèle dans les mêmes conditions. Le calcul des pourcentages d'inhibition de la parasitémie se fait de la manière suivante :

$$\text{pourcentage d'inhibition} = 100 - \left( \frac{\text{parasitémie de l'extrait} \times 100}{\text{parasitémie du solvant}} \right)$$

#### 5.2.1.2. Leishmaniose

##### 5.2.1.2.1. *in vitro* <sup>145</sup>

##### 5.2.1.2.1.1. Souches

###### \* Parasites

Il s'agit d'une souche (ref : MHOM/GF/84 CAY H 142) obtenue à Cayenne le 25 janvier 1984 à partir de la lésion unique d'un malade atteint de leishmaniose cutanée, et entretenue à l'Institut Pasteur de Cayenne sous forme promastigote par culture sur RPMI et sous forme amastigote par passage de hamster à hamster. Sa spéciation a été obtenue à l'aide de 12 iso-enzymes (Dr Desjeux, I.B.B.A., La Paz) et a permis de la rapporter à l'espèce *Leishmania mexicana amazonensis*.

###### \* Souris

Ce sont des souris Swiss provenant de l'élevage de l'Institut Pasteur de Cayenne

###### \* Hamsters

Il s'agit de hamsters dorés, *Mesocricetus auratus*, de l'élevage de l'Institut Pasteur de Cayenne.

##### 5.2.1.2.1.2. Milieux, réactifs et matériel.

###### \* Milieu de culture des macrophages

Le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) est utilisé comme milieu de culture des macrophages. Il est supplémenté par 2g.l<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, 4,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose, 10% de sérum de veau foetal (SVF, Flow), 0,2% de L. Glutamine (Eurobio) et 1% d'une solution d'antibiotique contenant 10mg.ml<sup>-1</sup> de néomycine, 10 mg.ml<sup>-1</sup> de streptomycine et 10 000 UI.ml<sup>-1</sup> de pénicilline.

#### \* Milieu de culture des parasites

Pour les parasites, le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640 (Gibco) supplémenté par  $2\text{g.l}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $8,31\text{g.l}^{-1}$  d'Hépes,  $10\text{ mg.l}^{-1}$  de gentamicine. Avant utilisation on ajoute 15% de SVF, 10% d'Ancotil ® (fluocytosine à 1%, Roche) et 1% d'une solution d'antibiotique contenant  $20\text{ mg.ml}^{-1}$  de streptomycine,  $20\text{ mg.ml}^{-1}$  de néomycine et  $20\ 000\text{ UI.ml}^{-1}$  de pénicilline.

#### \* Récolte des macrophages

Elle est effectuée à l'aide d'une solution saline isotonique, le PBS (Phosphate Buffered Saline) sans calcium ni magnésium, supplémenté par  $4,8\text{ U.ml}^{-1}$  d'héparine® (Choay).

#### \* Produits testés

- substances antileishmaniennes :

pentamidine méthanesulfonate (lot 254 0244) et N-méthyl-glucamine antimoniate (lot 254 0307) gracieusement fournis par le laboratoire Spécia.

- solvants :

◇ éthanol (Prolabo)

◇ glycérol (Prolabo)

◇ alcool isoamylique (Prolabo)

◇ diméthylsulfoxyde (Prolabo)

#### \* Colorations des préparations

Les réactifs suivants sont utilisés:

- solution de Zencker (eau distillée 100ml, chlorure mercurique 5g, bichromate de potassium 2,5g, sulfate de sodium 1g),

- acide acétique (Prolabo),

- solution de Lugol (eau distillée 50 ml, iode sublimé 2g, iodure de potassium 4g),

- thiosulfate de sodium à 5%,

- Giemsa Rapide (réactifs RAL)

- fixateur de Gurr (High Wycombe Bucks, U.K.)

- bleu trypan (Sigma)

#### \* Matériel

- plaques à 24 trous pour culture cellulaire (Nunc) à fond plat
- lamelles couvre objet de verre, 12 mm de diamètre
- seringues à usage unique (Plastipak<sup>®</sup>, Becton Dickinson).

#### 5.2.1.2.1.3. Protocoles expérimentaux

##### 5.2.1.2.1.3.1. *Maintien des parasites*

###### \* forme promastigote

Les parasites sont maintenus sous forme promastigote en culture *in vitro* par repiquages successifs (tous les quinze jours) dans du RPMI 1640 supplémenté par 15% SVF, 10% d'Ancotil<sup>®</sup>, et 1% de solution d'antibiotiques.

###### \* forme amastigote

Les formes amastigotes de *L.m. amazonensis* ont été obtenues par inoculation sous cutanée (au niveau de la face dorsale des pattes arrières des hamsters) des promastigotes de culture, les granulomes étant apparus 8 à 10 semaines plus tard. Par la suite, les hamsters sont inoculés directement avec des formes amastigotes, les granulomes se développant alors plus rapidement, en 6 semaines.

##### 5.2.1.2.1.3.2. *Test d'activité sur promastigotes en culture*

Une série de 15 tubes sont ensemencés avec 50 µl de milieu de culture contenant environ  $8 \cdot 10^6$  parasites.ml<sup>-1</sup> soit 400 000 parasites par tube. Par ailleurs, les extraits secs des plantes sont dissous dans du RPMI 1640 complet aux concentrations suivantes : 1 - 0,1 - 10<sup>-2</sup> et 10<sup>-3</sup> mg.ml<sup>-1</sup>. Les solutions obtenues sont distribuées dans les tubes à raison de 1 ml/tube et de trois tubes pour chaque concentration testée, dans les trois tubes témoins on rajoute simplement 1 ml de RPMI complet. Un comptage du nombre de *Leishmania* dans chaque tube est réalisé immédiatement à l'aide d'une cellule de Malassez. Les tubes sont alors stockés à 24-26° C, à l'abri de la lumière. Après quarante-huit heures, une nouvelle numération des parasites de chaque tube est réalisée et les moyennes des triplicates calculées. Les résultats sont exprimés par le calcul du pourcentage de promastigotes survivants par rapport aux tubes témoins.

### 5.2.1.2.1.3.3. *Test d'activité sur amastigotes infectant les macrophages*

#### \* Récolte des macrophages

Les souris, mâles ou femelles adultes (20 à 30 g), sont mises en diète hydrique environ douze heures avant expérimentation ; ce qui permet une réduction du volume du transit intestinal et diminue les risques de contamination fécale du matériel cellulaire récolté. Les animaux sont tués par rupture de la moelle cervicale : la tête étant maintenue sur un plan dur, une traction brusque est exercée sur la queue. Les souris sont immédiatement exsanguinées par section des vaisseaux du cou aux ciseaux afin de réduire les risques de contamination sanguine en cas d'hémorragie intrapéritonéale. Au niveau de l'abdomen, la peau est mouillée à l'éthanol à 70°C. Une incision est pratiquée dans la région périombilicale, en prenant soin de la décoller du plan musculaire ; à partir des lèvres de l'orifice on tire dans le sens craniocaudale, la peau étant alors ramenée au niveau des épaules et des cuisses de l'animal, ce qui découvre largement le péritoine. Dans la région sous ombilicale on injecte ensuite, rapidement, 8 à 10 ml de PBS froid hépariné (48 U d'héparine pour 1 ml de PBS). La présence d'héparine, l'absence de calcium et de magnésium dans le milieu et son maintien à basse température inhibent l'adhérence des macrophages péritonéaux aux supports durant les manipulations de récolte. Le liquide d'ascite est immédiatement récupéré par ponction lente au niveau d'un flanc, l'aiguille étant écartée des anses intestinales de façon à éviter le colmatage du biseau. 7 à 8 ml sont ainsi obtenus pour chaque souris. Le liquide d'ascite est stocké à 4 ° C dans un tube à centrifugation. Le protocole est répété avec d'autres souris. Les liquides péritonéaux de souris sont rassemblés et centrifugés à 900 T / mn, à 4°C pendant 10 mn. Le surnageant est rejeté et les cellules remises en suspension dans du PBS hépariné et centrifugées à nouveau. L'opération est renouvelée deux fois. Au dernier culot sont ajoutés 5 ml de milieu de culture (DMEM avec 10% SVF, 2% L. Glutamine, 1% d'antibiotique) ; la présence de sérum de veau foetal est nécessaire à l'adhérence des macrophages. La solution est homogénéisée et maintenue à la température de la glace fondante. Les éléments cellulaires sont comptés à la cellule de Thomas et la concentration est ajustée afin d'obtenir  $2.10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup> (chaque souris permet d'obtenir environ  $10^6$  cellules). Les cellules sont réparties dans une boîte de Costar à 24 puits contenant 24 lamelles

stériles, à raison de 100 µl par lamelle soit  $2 \cdot 10^5$  cellules environ. La boîte est incubée en étuve à 37°C en présence d'air enrichi de 6 à 8 % de CO<sub>2</sub> pendant 2 à 3 heures. Les cellules ayant adhéré, la solution est éliminée à la pipette Pasteur (ce qui permet de rejeter les cellules en suspension) et remplacée par du milieu nutritif complet à raison de 1 ml par cupule. Le pourcentage des macrophages parmi les cellules récoltées est estimé entre 40 et 60 %, les autres cellules étant des lymphocytes, des mastocytes et quelques rares polynucléaires neutrophiles.

#### \* Préparation des parasites et infection

Pour obtenir des amastigotes, un hamster présentant un granulome non ulcéré, de taille suffisante est sélectionné. L'animal est tué à l'éther. La patte arrière est nettoyée à l'alcool iodé puis à l'éthanol à 70°. A l'aide d'une pince et d'un bistouri stériles, on résèque le granulome, le clivage se faisant d'autant plus facilement que la lésion est de taille importante. Le granulome est alors haché au dessus d'un mortier contenant du sable stérile et 5 ml de chlorure de sodium à 0,9 %. Le tout est homogénéisé au pilon et la suspension est recueillie à la pipette et centrifugée à 2000 t/mn pendant 10 mn (à 4° C). On obtient trois couches : le surnageant contenant des débris de parasites et de cellules, le fond avec le sable et les gros débris du granulome, et la couche intermédiaire formée principalement de parasites et de globules rouges. Cette dernière est reprise dans un autre tube, rincée au chlorure de sodium à 0,9 % et centrifugée à nouveau, ce qui permet de séparer les globules rouges des parasites qui se présentent alors sous forme d'une couche blanche, crémeuse. Les parasites sont repris dans du milieu nutritif (DMEM avec 10 % SVF, 2 % L.Glutamine et 1 % de la solution d'antibiotiques précédente), dilués et comptés à la cellule de Thomas. Un granulome permet d'obtenir environ  $10^8$  parasites. La concentration est ajustée à  $10^6$  parasites /ml. L'infection des macrophages se fait en remplaçant le milieu nutritif des cellules par la suspension de parasites, à raison d'un millilitre par lamelle soit  $10^6$  parasites, ce qui donnerait la proportion de cinq parasites pour une cellule. En fait, compte tenu du pourcentage de macrophages dans les cellules récoltées on obtient un chiffre théorique de 10 parasites par macrophage. Les boîtes sont remises à l'étuve à 37° C sous atmosphère de 6 à 8 % de CO<sub>2</sub> pendant une heure, temps suffisant pour obtenir l'infection des macrophages. Le milieu qui contenait les parasites est alors éliminé et remplacé par du milieu neuf.

\* Test d'activité sur les amastigotes intracellulaires

Après l'infection des macrophages les cellules sont mises dans un milieu nutritif (DMEM avec 10 % SVF, 2 % L. glutamine, 1 % antibiotique) qui contient les extraits dissous à 1 - 0,1 - 0,01 et 0,001 mg.ml<sup>-1</sup>. Trois cupules sont préparées pour chaque concentration testée. Par ailleurs, trois lamelles de cellules infectées non traitées serviront de témoin. Les boîtes sont remises à incuber en étuves pendant 48 heures. Passé ce délai, les lamelles sont fixées et colorées, après un rinçage au PBS.

\* Fixation et coloration des préparations

Les préparations sont fixées par une solution de Zencker supplémentée par 4 % d'acide acétique pendant 10 minutes, puis rincées à l'eau du robinet. Le mordantage est effectué par la solution de Lugol pendant 5 minutes et suivi par un nouveau rinçage au thiosulfate de sodium à 5 %. Les lamelles sont ensuite colorées au Giemsa à 10% pendant 15 minutes, rincées à l'eau du robinet et séchées. Pour le montage, les lamelles sont collées sur une lame avec une goutte de fixateur de Gur, la face de la lamelle qui sert de support aux cellules regardant la lame.

\* Lecture

La lecture se fait à l'immersion (grossissement 100X). Pour chaque lamelle, dix champs sont examinés. Le nombre de macrophages et le nombre de parasites intracellulaires sont notés pour chaque champ. La moyenne des dix champs puis la moyenne des triplicates est calculée. On en déduit, pour chaque concentration testée et pour les témoins, le nombre moyen de parasites par cellule, et l'indice de survie est calculée de la façon suivante :

$\text{I.S.} = \frac{\text{nb de parasites dans 100 cellules traitées}}{\text{nb de parasites dans 100 cellules témoins}} \times 100$
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Il y a une vingtaine de cellules par champ, on examine donc environ deux cents cellules par lamelle soit six cents cellules pour chaque concentration testée (trois lamelles par concentrations testée).

\* Tests de viabilité cellulaire.

Pour chaque extrait de plante étudiée, des tests de viabilité cellulaire sont effectués sur des macrophages non parasités. Les cellules sont mises au contact des produits à tester aux différentes concentrations (1 - 0,1 - 0,01 et 0,001 mg.ml<sup>-1</sup>) pendant 48 heures. Un triplicat de lamelles est réalisé pour chaque concentration testée, ainsi que trois lamelles témoins. Au moment de la lecture, le milieu contenant les extraits dissous est remplacé par du bleu Trypan à 0,4 %. après une minute de contact, les lamelles sont sorties des cupules, retournées sur une lame et examinées au microscope ; le cytoplasme des cellules mortes se colore en bleu, ce qui les distingue des cellules viables qui ne prennent pas le colorant. Le pourcentage de survie des macrophages est alors calculé par rapport au témoin.

5.2.1.2.2. *in vivo*

5.2.1.2.2.1. Souches

\* Il s'agit de la même souche (ref : MHOM/GF/84 CAY H 142) que celle utilisée pour les essais *in vitro* permettant ainsi d'avoir des résultats homogènes.

\* Les souris BALB/c utilisées à Cayenne sont venues par avion de l'élevage industriel de IFFA-CREDO. Les contrôles sanitaires effectués par l'éleveur les donnent exemptes des affections courantes des rongeurs.

5.2.1.2.2.2. Protocoles expérimentaux

Un nodule extrait d'un hamster infecté par la souche H142 six semaines avant, est homogénéisé dans un broyeur de Potter stérile et repris dans du RPMI 1640 seul. La suspension est diluée pour injecter, une quantité de 200 000 amastigotes dans une des pattes arrière de souris BALB/c dans un volume de 50 µl. Une heure après l'infection, les produits à tester et les substances de référence sont injectés par la voie sous-cutanée pendant 5 jours consécutif. Un témoin solvant est préparé dans les mêmes conditions. Une patte arrière sur deux est infecté, l'autre patte reste indemne de toute infection. La mesure de l'épaisseur des pattes avec un pied à coulisse se fait une semaine après l'infection et cela chaque semaine pendant huit semaines, temps nécessaire pour le développement du nodule leishmanien avant ulcération<sup>203</sup>. Le calcul de l'accroissement en épaisseur du nodule se fait en soustrayant

l'épaisseur de la patte non infectée de l'épaisseur de la patte infectée, ce qui élimine les facteurs de croissance corporelle individuelle des rongeurs.

## 5.2.2. Tests réalisés à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

### 5.2.2.1. Paludisme in vivo

#### 5.2.2.1.1. Souche

Une souche référencée de *P. yoelii* provenant du Muséum Nationale d'Histoire Naturelle est entretenue périodiquement au laboratoire de parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry par passage sur des souris CD1 mâles jeunes de  $20\text{g} \pm 2\text{g}$  provenant de l'élevage industriel de Charles Rivers France. Les souris sont garanties sans infection par l'éleveur qui assure les contrôles de routines concernant les pathologie les plus courantes des rongeurs, avec une vérification une fois par an de la présence d'*Eperythrozon coccoides*. Cette souche de *P. yoelii* par passage permanent sur les rongeurs conserve sa virulence en tuant les souris en une dizaine de jours.

#### 5.2.2.1.2. Réactifs

\*Réactif de Marcano préparé au laboratoire pour diluer les hématies parasitées au 1/200 et permettre ainsi leur numération.

\* eau physiologique à 9 g de NaCl par litre stérile pour la dilution finale avant injection des hématies parasitées.

\* des seringues hypodermiques de 1 ml graduées au 1/10 et équipées d'aiguilles dite à tuberculine de petite taille permettant à la fois l'injection des parasites et des produits à tester.

\* Héparine (Choay) qui assure l'incoagulabilité du sang recueilli de la souris donneuse.

\* Colorant de Giemsa rapide (RAL) dilué à 10 % avec de l'eau du robinet pour assurer une coloration des frottis en 10 mn.

### 5.2.2.1.3. Protocole expérimental

Les souris mâles sont préférées afin que le test ne soit pas perturbé par le cycle sexuel hormonal de la femelle. On démarre l'infestation à l'aide d'une souris donneuse dont 20% des hématies sont parasitées. Le sang parasité est récupéré par une ponction au sinus retro-orbitaire à l'aide d'une pipette Pasteur héparinée. Une numération des hématies ainsi qu'un frottis sont effectués pour évaluer le nombre de parasites dans la prise de sang afin d'injecter 10 millions de parasites par souris dans 0,1 ml de sang dilué dans de l'eau physiologique. Une souris avec 20% de parasitémie permet d'infester ainsi environ une centaine de souris. L'injection peut se faire en intrapéritonéale ou en intraveineuse. La voie intrapéritonéale est plus pratique et assure des temps de manipulation plus courts. Mais la parasitémie obtenue est moins régulière qu'en intra-veineuse. Il faut d'ailleurs veiller en intra-péritonéale à enfoncer l'aiguille assez nettement dans un premier temps puis à retirer partiellement l'aiguille pour assurer une injection dans la cavité péritonéale et non dans les viscères eux-mêmes. Les souris sont réparties au hasard en lots de 5. Le jour de l'infestation est indiqué comme jour J0 et est aussi le premier jour de l'introduction des composés à tester, on injecte ainsi quatre doses médicamenteuses à J0, J1, J2, J3. Des lots témoins solvants et témoins curatif avec de la chloroquine (SPECIA) à  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  sont traités de la même façon. A J4, un frottis est effectué à partir du sang prélevé au bout de la queue de la souris et coloré à la coloration de Giemsa. Les hématies parasitées sont données comme un pourcentage du total des hématies présentes dans les 5 à 10 champs de microscope lus par lame. Les résultats finaux sont calculés comme le pourcentage d'inhibition du lot traité par rapport au lot témoin n'ayant reçu que le solvant. Un écart type sur la moyenne des mesures est donné pour chaque lot de 5 souris.

### 5.2.2.2. Leishmaniose

#### 5.2.2.2.1. *in vitro*

##### 5.2.2.2.1.1. Souches

Il s'agit de la même souche de *Leishmania mexicana amazonensis* (ref : MHOM/GF/84 CAY H 142) obtenue à Cayenne le 25 janvier 1984 à partir de la lésion unique d'un malade atteint de leishmaniose cutanée et que nous avons transférée à Châtenay-Malabry à partir d'un

hamster infecté et de cultures de promastigote sur RPMI.

Une autre souche de la même espèce LV 79 (ref : MPRO/BR/72:M1841) nous a été aimablement donnée en 1988 par Rabinovitch de l'Institut Pasteur de Paris. Cette souche est maintenue infectante par passages successifs sur souris BALB/c à l'Institut Pasteur puis sur hamster au laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry.

#### 5.2.2.2.1.2. Milieux et réactifs

La culture des leishmanies est assurée sur milieu RPMI 1640 (GIBCO) contenant de l'HEPES, des bicarbonates, de la glutamine. Ces réactifs sont ajoutés par l'industriel et le milieu est complété extemporanément dans le laboratoire avec 10 % de sérum de veau foetal (GIBCO), 50 µl de Penicilline G à 200 000 U.I..ml<sup>-1</sup>(SPECIA) et 50 µl de Streptomycine à 200 mg.ml<sup>-1</sup> (SPECIA)

#### 5.2.2.2.1.3. Protocoles expérimentaux<sup>204</sup>

##### *5.2.2.2.1.3.1. Préparations des macrophages*

Au préalable, des lamelles rondes (PROSCIENCE) sont préparées, rincées pendant 24 heures à l'acide nitrique dilué au tiers dans de larges boîtes de Pétri en verre (diamètre 10 cm). Ensuite, les lamelles sont rincées à l'eau distillée jusqu'à ce que les bains de rinçage soit au pH de l'eau distillée. Elles sont ensuite séchées dans ces boites de Pétri munies d'un disque de papier filtre évitant aux lamelles d'adhérer au verre. Elles sont stérilisées par la chaleur sèche au Poupinel. Un million de macrophages péritonéaux non inflammatoires sont prélevés par souris (ici des souris black 6). La souris est tuée par rupture de la moelle épinière par traction cranio-caudale puis elle est trempée dans l'alcool à 70°C. La peau abdominale est disséquée en pratiquant une boutonnière, et ouverture large dégageant la peau de la paroi musculaire. 5 ml de PBS sans héparine sont injectés dans le péritoine à froid avec une aiguille de 18GX1 1/2 ou 1.2X40 mm au centre du péritoine en soulevant la paroi abdominale avec une pince. Le PBS froid est reponctionné après plusieurs tractions avec la pince sur la paroi abdominale pour assurer le bon détachement des macrophages. La manipulation de récupération des macrophages se déroule sous la hotte à flux laminaire. Les macrophages sont poolés dans un

tube à centrifuger de 50 ml. La suspension est centrifugée à 1600 t/mn pendant 10 mn à froid. Le surnageant est éliminé. Les macrophages sont mis en suspension dans un volume adéquat de milieu RPMI complet pour la numération et ils sont passés à la seringue pour assurer une bonne désagrégation des agrégats de cellules (aiguilles de 0.45 X 12 mm ou 26G X 1/2). Seulement 20 à 30 % de ces cellules (après numération des cellules autres que les hématies) sont des macrophages qui adhéreront à la lamelle de verre. Après numération, une concentration de  $10^5$  cellules dans 100  $\mu$ l de milieu complet avec 5% de SVF et 50  $\mu$ l de solution de gentamicine doit être obtenue. Des aliquots de 100  $\mu$ l sont déposés sur chacune des lamelles de verre placées dans les puits d'une boîte à culture à 24 puits. Les cellules "placent" à 37 °C pendant 2 heures sous 5% de CO<sub>2</sub> dans une étuve à CO<sub>2</sub>. Les lamelles sont rincées deux à trois fois avec 0,5ml de RPMI+MOPS sans SVF pour éliminer les impuretés et surtout les cellules non adhérentes. Le surnageant sur les lamelles est remplacé par du milieu frais (RPMI + glutamine + SVF + gentamicine) à raison de 0.5 ml de milieu par puits.

#### 5.2.2.2.1.3.2. *Préparations des amastigotes*

Pour obtenir le nombre d'amastigotes nécessaire aux manipulations, des souris BALB/c sont utilisées. Les souris infectées présentant des granulomes même surinfectés sont utilisables. En moyenne, entre 800 millions et un milliard d'amastigotes sont obtenus avec les deux pattes arrières d'une souris bien infectée. Les souris sont tuées par rupture de la moelle épinière. Les pattes infectées sont coupées et placées dans de l'alcool à 70°C pour le transport jusqu'à la hotte. Les pattes sont placées dans du milieu de Hanks contenant 25 mmol.l<sup>-1</sup> de tampon MOPS (SIGMA) et 100  $\mu$ l de solution mère de gentamicine /10 ml de milieu. La partie en croûte de l'ulcération est éliminée. Chaque granulome est dilacéré en petits morceaux que l'on place dans un broyeur de Potter stérile. Le broyage est fait le plus finement possible dans environ 5 ml de milieu. Chaque granulome broyé est transféré dans un tube à centrifuger de 20 ml où est ajouté encore 5ml de milieu. Une première centrifugation à froid à 500 t/mn sépare les débris de tissus d'avec les amastigotes qui restent en suspension. La suspension est récupérée délicatement en laissant quelques mm de suspension au fond du tube à centrifuger. Elle est recentrifugée toujours à froid pendant 10 mn à 2800 t/mn et le surnageant est vidé dans un bécher de

décontamination. Le culot reste bien accroché au fond du tube. Les culots sont lavés trois fois toujours avec du milieu de Hanks+ MOPS. Le culot est remis en suspension dans 2 ml de milieu complet (RPMI+MOPS+SVF 5% +gentamicine) pour permettre sa désagrégation par passage à la seringue. Une dilution d'un aliquot au 1/10 permet de compter les amastigotes. Le volume de milieu nécessaire est ajouté pour obtenir une concentration de  $15 \cdot 10^6$  amastigotes par ml permettant une bonne conservation pendant 24 à 48 heures à 34°C à l'air.

#### 5.2.2.2.1.3.3. *Infection des macrophages*

Après vérification vingt-quatre heures après de la non contamination des cultures de macrophages et d'amastigotes, les amastigotes sont recentrifugés et placés dans le RPMI complet à raison d'un rapport amastigotes/macrophages égale à 5, c'est à dire une concentration de 500 000 amastigotes pour 0.5 ml de milieu. Le milieu des puits contenant les macrophages est remplacé par cette suspension d'amastigotes. L'infection se fait durant une nuit.

#### 5.2.2.2.1.3.4. *Test des composés*

Le surnageant est éliminé le lendemain, et les composés à tester sont mis en contact avec les cultures soit sous la forme de 0.5ml de milieu complet par puits et 10 µl de solution des composés à tester soit les composés à tester sont dissous au préalable dans les 0.5 ml de milieu. les cultures sont placées de nouveau à l'étuve à 35°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant 48 heures. Le milieu est remplacé à ce moment là et laissé incuber encore 24 heures avant la fixation. Le temps d'exposition aux composés peut être variable.

#### 5.2.2.2.1.3.5. *Coloration et lecture*

Les lamelles sont fixées au méthanol pendant 10 mn directement dans les puits. Les lamelles sont colorées au GIEMSA à 10% pendant 10 mn. Elles sont rincées abondamment à l'eau du robinet dans les puits et mises à sécher sur du papier filtre en utilisant le couvercle de la boîte de culture comme protection et comme repère des lamelles. Les lamelles sont montées avec de la résine Eukitt à inclusion très fluide. Elles sèchent au moins deux heures et la lecture des macrophages parasités et non parasités (sans compter le nombre d'amastigotes par

macrophage) est faite au grossissement 40 fois. Pour chaque puit, le pourcentage de cellules parasitées est calculé par rapport au nombre total de macrophages sur la lamelle. Pour chaque triplicate, l'écart-type des mesures est calculé ainsi que l'indice de survie des amastigotes par rapport au témoin.

#### 5.2.2.2.2. *In vivo*

##### 5.2.2.2.2.1. Souches

\* L'isolat de *L. m. amazonensis* LV 79 (ref : MPRO/BR/72:M1841) a été utilisé pour les tests *in vivo*.

\* Les souris BALB/c proviennent de l'élevage industriel de Charles Rivers France avec les mêmes garanties sanitaires que les souris CD1.

##### 5.2.2.2.2.2. Protocoles expérimentaux

Un nodule extrait d'un hamster infecté par la souche LV79, 6 semaines avant, est homogénéisé dans un broyeur de Potter stérile et repris dans du RPMI 1640 à diluer pour obtenir une injection dans une des pattes arrière de souris BALB/c, une quantité de 200 000 amastigotes dans un volume de 50  $\mu$ l.

Quinze jours après l'infection, les produits à tester et les substances de références sont injectés par la voie sous-cutanée pendant 5 jours consécutifs soit injectés le jour J0 en une seule dose par injection dans la lésion suivant la quantité de principe actif disponible. Un témoin de solvant est préparé dans les mêmes conditions. Les deux pattes arrière sont infectées. La mesure de l'épaisseur des pattes se fait avec un appareil à mesurer le pli cutané une semaine après l'infection et cela chaque semaine pendant huit semaines, temps nécessaire pour le développement du nodule leishmanien avant ulcération<sup>203</sup>.

### 5.2.3. Résultats des essais sur le paludisme expérimental des rongeurs

	% parasitémie 5 jours	%d'inhibition 5 jours
Lot 1 (5 souris) témoin solvant 100 µl DMSO / souris / 4 jours en S.C.	14 ± 5	
Lot 2 (5 souris) témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	0	100
Lot 3 (5 souris) MS 741 fraction "insoluble" du bois de tige d' <i>Andira coriacea</i> 1g/kg / souris / 3 jours en S.C.	26 ± 5 une souris est morte	0
Lot 4 (5 souris)MS 744 fraction CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> du bois de tronc de <i>Hymenolobium flavum</i> 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	24 ± 19	0
Lot 5 (5 souris) MS 744 fraction "insoluble" du bois de tronc de <i>Hymenolobium flavum</i> 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	14 ± 6	0
Lot 6 (5 souris) MS 745 fraction éthero-pétroléique bois de tronc de <i>Wacapoua americana</i> 1g/kg / souris / 3 jours en S.C.	25 ± 2 deux souris sont mortes	0
Lot 7 (5 souris) MS 741 fraction CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> du bois de tronc de <i>Wacapoua americana</i> 800 mg/kg / souris / 2 jours en S.C.	22 ± 12	0
Lot 8 (5 souris) JFK 72 fraction CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de <i>Ludwigia hyssopifolia</i> P.E. 1g/kg / souris / 3 jours en S.C.	18 ± 11	0
Lot 9 (5 souris) JFK 72 fraction "insoluble" de <i>Ludwigia hyssopifolia</i> P.E. 800 mg/kg / souris / 3 jours en S.C.	20 ± 15	0
Lot 10 (5 souris) JFK 72 fraction butanolique de <i>Ludwigia hyssopifolia</i> P.E. 1g/kg / souris / 2 jours en S.C.	- toutes les souris sont mortes	-
Lot 11 (5 souris) P et G 1964 fraction butanolique de <i>Sapium ciliatum</i> F. 1g/kg / souris / 1 jour en S.C.	- toutes les souris sont mortes	-

Tableau N°15 : essais de fractions sur le modèle *Plasmodium berghei yoelii* infectant la souris.

	% parasitémie 5 jours	%d'inhibition 5 jours
Lot 1 (5 souris) témoin solvant 100 µl DMSO / souris / 4 jours en S.C.	20 ± 5	
Lot 2 (5 souris) témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	0	100
Lot 3 (5 souris) P et G 1971 fraction à l'éther de pétrole d' <i>Eugenia sp nov</i> F. 1g/kg / souris / 3 jours en S.C.	23 ± 9 une souris est morte	0
Lot 4 (5 souris) P et G 1971 fraction CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> d' <i>Eugenia sp nov</i> F. 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	22 ± 3	0
Lot 5 (5 souris) P et G 1971 fraction butanolique d' <i>Eugenia sp nov</i> F. 1g/kg / souris / 1 jour en S.C.	23 quatre souris sont mortes	0
Lot 6 (5 souris) P et G 1971 fraction aqueuse d' <i>Eugenia sp nov</i> F. 1g/kg / souris / 3 jours en S.C.	21 ± 5 trois souris sont mortes	0
Lot 7 (5 souris) JFK 132 fraction à l'hexane d' <i>Eichornia crassipes</i> P.E. 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	20 ± 7	0
Lot 8 (5 souris) JFK 132 fraction CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> d' <i>Eichornia crassipes</i> P.E.. 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	19 ± 4	4
Lot 8 (5 souris) JFK 132 fraction butanolique d' <i>Eichornia crassipes</i> P.E. 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	20 ± 7	0
Lot 9 (5 souris) JFK 132 fraction aqueuse d' <i>Eichornia crassipes</i> P.E. 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	19 ± 8	0
	% parasitémie 5 jours	%d'inhibition 5 jours
Lot 1 (5 souris) témoin infection	28 ± 16	
Lot 1 (5 souris) témoin solvant 100 µl DMSO / souris / 4 jours en S.C.	22 ± 18	
Lot 2 (5 souris) témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	0	100
Lot 3 (5 souris) JFK 106 fraction à l'éther de pétrole de <i>Sipanea pratensis</i> P.E. 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	23 ± 15	0
Lot 4 (5 souris) JFK 106 fraction CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de <i>Sipanea pratensis</i> P.E. 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	20 ± 12	0
Lot 5 (5 souris) JFK 106 fraction butanolique de <i>Sipanea pratensis</i> P.E. 1g/kg / souris / 4 jour en S.C.	21 ± 12	24

Tableau N°15 (suite) : essais de fractions sur le modèle *Plasmodium berghei yoelii* infectant la souris.

	% parasitémie 5 jours	%d'inhibition 5 jours
Lot 6 (5 souris) JFK 106 fraction aqueuse de <i>Sipanea pratensis</i> P.E. 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	34 ± 8	0
Lot 7 (5 souris) PG 1964 fraction butanolique de <i>Sapium ciliatum</i> F. 500 mg/kg / souris / 1 jours en S.C.	-	-
Lot 1 (5 souris) témoin infection	55 ± 11	
Lot 2 (5 souris) témoin solvant 100 µl DMSO / souris / 4 jours en S.C.	39 ± 12	
Lot 3 (5 souris) témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	0	100
Lot 4 (5 souris) PG 1964 fraction butanolique de <i>Sapium ciliatum</i> F. 100 mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	49 ± 31	0
Lot 5 (5 souris) JFK 72 fraction butanolique de <i>Ludwigia hyssopifolia</i> P.E. 500 mg/kg / souris / 1 jours en S.C.	77	0
Lot 6 (5 souris) JFK 72 fraction butanolique de <i>Ludwigia hyssopifolia</i> P.E. 100 mg/kg / souris / 2 jours en S.C.	-	-
Lot 7 (5 souris) JFK 77 fraction à l'éther de pétrole de <i>Phyllanthus amarus</i> P.E. 1g/kg / souris / 4 jour en S.C.	46 ± 15	0
Lot 8 (5 souris) JFK 77 fraction méthanolique de <i>Phyllanthus amarus</i> P.E. 1g/kg / souris / 4 jour en S.C.		toutes les souris sont mortes
Lot 9 (5 souris) MS 810 fraction à l'hexane du bois de tronc de <i>Peltogyne</i> sp 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	56 ± 10	0
Lot 10 (5 souris) MS 810 fraction CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> du bois de tronc de <i>Peltogyne</i> sp 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	47 ± 10	0
Lot 11 (5 souris) MS 810 fraction "insoluble" du bois de tronc de <i>Peltogyne</i> sp 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	42 ± 13	0
Lot 12 (5 souris) MS 811 fraction à l'hexane du bois de tronc de <i>Andira coriacea</i> 1g/kg / souris / 2 jours en S.C.	58 ± 13	0
Lot 13 (5 souris) MS 811 fraction CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> du bois de tronc de <i>Andira coriacea</i> 1g/kg / souris / 2 jour en S.C.	50	0
Lot 14 (5 souris) MS 811 fraction "insoluble" du bois de tronc de <i>Andira coriacea</i> 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	45 ± 12	0

Tableau N°15 (suite) : essais de fractions sur le modèle *Plasmodium berghei yoelii* infectant la souris.

	% parasitémie 5 jours	%d'inhibition 5 jours
Lot 15 (5 souris) DS 2103 fraction CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> du bois de tronc de <i>Andira inermis</i> 1g/kg / souris / 1 jours en S.C.	33 ± 20  trois souris sont mortes	16
Lot 16 (5 souris) DS 2103 fraction "insoluble" du bois de tronc de <i>Andira inermis</i> 1g/kg / souris / 4 jours en S.C.	45 ± 10  une souris est morte	0
Lot 1 (5 souris) témoin solvant 100 µl DMSO / souris / 4 jours en S.C.	38 ± 10	
Lot 2 (5 souris) témoin chloroquine 5mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	0	100
Lot 3 (5 souris) JFK 77 fraction méthanolique de <i>Phyllanthus amarus</i> P.E. 500 mg/kg / souris / 2 jours en S.C.	26 ± 19  deux souris sont mortes	32
Lot 9 (5 souris) témoin solvant 100 µl DMSO / souris / 4 jours en S.C.	25 ± 12	
Lot 3 (5 souris) MS 645 percolation éthanolique de <i>Fagara rhoifolia</i> E.T. 1g/kg / souris / 1 jour en S.C.	51  quatre souris sont mortes	0
Lot 10 (5 souris)MS 645 percolation éthanolique de <i>Fagara rhoifolia</i> E.T. 100 mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	36 ± 14	0
Lot 8 (5 souris) quinine 50 mg/kg / souris / 4 jours en S.C.	1 ± 1	94
Lot 12 (5 souris) AF 66 percolation éthanolique de <i>Abuta bullata</i> R. 100 mg/kg / souris / 1 jour en S.C. 10 mg/kg / souris / 3 jours en S.C.	36 ± 17  une souris est morte	0

Tableau N°15 (fin) : essais de fractions sur le modèle *Plasmodium berghei yoelii* infectant la souris.

5.2.4. Résultats du criblage antileishmanien *in vitro*

Identification des plantes testées	modèles expérimentaux	2mg/ml	1mg/ml	0.5 mg/ml	0.1mg/ml	0.01mg/ml	0.001mg/ml
AMARYLLIDACEAE <i>Hymenocallis tubiflora</i> Bu. (MS 561) sol. = 0.9 mg/ml	A Promastig. survivants %		29		100	96	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %						
AMARYLLIDACEAE <i>Hymenocallis tubiflora</i> Bu. (MS 561) sol. à saturation = 9.6 mg/ml	A Promastig. survivants %						
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		NC *		NC	75	85
BIGNONIACEAE <i>Callychlamys latifolia</i> T. (P et G 1973) sol. = 0.9 mg/ml	A Promastig. survivants %		100		100	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		54		100	100	95
BIGNONIACEAE <i>Callychlamys latifolia</i> T. (P et G 1973) sol. à saturation = 35 mg/ml	A Promastig. survivants %	69	100	100			
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	47	84	85			
BIGNONIACEAE <i>Jacaranda copaia</i> F.(CF 2397) sol. = 0.8 mg/ml	A Promastig. survivants %		0		90	85	94
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		NC		92	98	96
CAESALPINIACEAE E.T. (MS 626) sol. > 2 mg/ml	A Promastig. survivants %	0	56	91	100	-	
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		75	76	82	95	
		0	78	98	99	99	

Tableau N°20 : essai d'activité comparé des extraits aqueux de plantes présumées leishmanicides sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*

modèle A = promastigotes en culture

modèle B = amastigotes infectant les macrophages de souris.

Organes testés : F.= feuille; T.= tige; R.= racine; Rh.= rhizome; P.A.= partie aérienne; P.E.= plante entière; E.T.= écorce de tige; Bu= bulbe.

\*NC=non comptable; les débris cellulaires des macrophages tués empêchant le dénombrement des amastigotes

Identification des plantes testées	modèles expérimentaux						
		2mg/ml	1mg/ml	0.5 mg/ml	0.1mg/ml	0.01mg/ml	0.001 mg/ml
CLUSIACEAE <i>Vismia</i> sp E.T. (MS 215) sol. < 5 mg/ml	A Promastig. survivants %		82		93	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		NC		96	96	98
CLUSIACEAE <i>Vismia</i> sp E.T. (MS 216) sol. < 5 mg/ml B	A Promastig. survivants %		83		100	86	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		NC		95	100	92
DILLENIACEAE <i>Dolioscarpus dentatus</i> T. (MS 271)	A Promastig. survivants %		18		61	82	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		NC		90	92	93
LECYTHIDACEAE <i>Gustavia angusta</i> F. (MS 197) sol. = 1mg/ml	A Promastig. survivants %		94		88	95	98
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		6		87	81	96
MORACEAE <i>Cecropia obtusa</i> F. (JFK 1) sol. < 4mg/ml	A Promastig. survivants %		6		85	88	60
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		NC		93	100	91
			0.3mg/ml	0.06mg/ml	0.03mg/ml	0.015mg/ml	0.003mg/ml
MELASTOMACEAE <i>Clidemia hirta</i> var. <i>elegans</i> P.E. (JFK 70) sol. = 30 mg/ml dans DMSO	A Promastig. survivants %		60	85	85	85	
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	96	98	98	98	100	-

Tableau N°20 (suite) : Essai d'activité comparé des extraits aqueux de plantes présumées leishmanicides sur le modèle *Leishmania mexicana amazonensis* in vitro  
modèle A = promastigotes en culture,  
modèle B = amastigotes infectant les macrophages de souris.

Identification des plantes testées	modèles expérimentaux	2mg/ml	1mg/ml	0.5 mg/ml	0.1mg/ml	0.01mg/ml	0.001 mg/ml
RUBIACEAE <i>Faramea guianensis</i> F.(JJDG 7489) sol. <= 11mg/ml	A Promastig. survivants %	37	38		81	76	95
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		5		87	97	100
RUBIACEAE <i>Faramea guianensis</i> F. (JJDG 7489) sol. <= 10mg/m	A Promastig. survivants %						
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	2	29		55		
RUBIACEAE <i>Faramea guianensis</i> F. (JJDG 7489) sol. à saturation = 21.6 mg/ml	A Promastig. survivants %						
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	32	57	100			
RUBIACEAE <i>Faramea guianensis</i> T.(JJDG 7489) sol. = 1 mg/ml	A Promastig. survivants %		100		100	72	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		34		62	69	95
RUBIACEAE <i>Faramea guianensis</i> F.(JJDG 8834) sol. = 5mg/ml	A Promastig. survivants %	100	100	100	100		
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	NC	13	69	98		
RUBIACEAE <i>Faramea guianensis</i> T.(JJDG 8834) sol. = 1mg/ml	A Promastig. survivants %		21	41	100	100	
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		15	41	73	-	
			90	100	100	-	

Tableau N°20 (suite) : essai d'activité comparé des extraits aqueux de plantes présumées sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*

modèle A = promastigotes en culture;

modèle B = amastigotes infectant les macrophages de souris.

\* NC=non comptable; les débris cellulaires des macrophages tués empêchent le dénombrement des amastigotes

plantes testées	modèles expérimentaux	2mg/ml	1mg/ml	0.5 mg/ml	0.1mg/ml	0.01mg/ml	0.001 mg/ml
RUBIACEAE <i>Faramea guianensis</i> R. (JJDG 8834) sol. = 0.5mg/ml	A Promastig. survivants %			100	100	100	
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %			66	96	98	
RUBIACEAE <i>Faramea lourteigiana</i> R.(MS 639) sol: > 2mg/ml	A Promastig. survivants %	90	92	100	100	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	94	98	98	99		
RUBIACEAE <i>Faramea lourteigiana</i> P.A.(MS 639) sol. > 2mg/ml	A Promastig. survivants %	63	85	100	100	100	
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	NC	87	NC	99	100	
RUBIACEAE <i>Faramea capillipes</i> P.A.(MS 653) sol. > 2mg/ml	A Promastig. survivants %	65	76	95	100	-	
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	0	90	95	97	97	
VITACEAE <i>Cissus erosa</i> P.A.(CF 2374) sol. <= 3mg/ml	A Promastig. survivants %		100		100	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		88		96	87	96
ZINGIBERACEAE <i>Reinealmia guianensis</i> Rh.(JFK 5) sol. = 4 mg/ml	A Promastig. survivants %		41		61	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		NC		91	92	97
			20		100	100	100

Tableau N°20 (suite) : essai d'activité comparé des extraits aqueux de plantes présumées leishmanicides sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis* in vitro

modèle A = promastigotes en culture

modèle B = amastigotes sur macrophages de souris.

\*NC=non comptable ; les débris cellulaires des macrophages tués empêchent le dénombrement des amastigotes

Identification des plantes testées	modèles expérimentaux	2mg/ml	1mg/ml	0.5 mg/ml	0.1mg/ml	0.01mg/ml	0.001 mg/ml
		ZINGIBERACEAE <i>Renealmia guianensis</i> Rh.(JFK 5) sol.à saturation B = 28.5 mg/ml	Promastig. A survivants %				
	Amastig. intracell. I.S.	-	89		96	91	94
	Macrophages survivants %	0	80		100	100	100

Tableau N°20 (fin) : Essai d'activité comparé des extraits aqueux de plantes présumées leishmanicides sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*

modèle A = promastigotes en culture

modèle B = amastigotes sur macrophages de souris.

### 5.2.5. Résultats des essais antileishmaniens *in vitro* sur les fractions séparées

Fractions testées	modèles expérimentaux	2mg/ml	1mg/ml	0.5 mg/ml	0.1mg/ml	0.01mg/ml	0.001 mg/ml
Extrait CHCl <sub>3</sub> sol.à saturation = 3mg/ml	A Promastig. survivants %		0	17	71		
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		-	-			
Extrait acétate d'éthyle - précipité sol. > 3mg/ml	A Promastig. survivants %	59	80	82	88		
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	-	0	38	87		
Extrait à l'acétate d'éthyle sol. <= 0.1 mg/ml	A Promastig. survivants %						65
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %						100
Extrait à l'acétone sol. > 3mg/ml	A Promastig. survivants %	0	11	25	49		
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	-	-	NC(2)*	92(80)*		
Extrait éthanolique sol.>3mg/ml	A Promastig. survivants %	53	47	68	70		
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		NC	91	100		
décoction aqueuse sol.> 3mg/ml	A Promastig. survivants %	54	43	73	87		
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	95	100	100	100		

\*cet essai a été recommencé après reséchage de la drogue.

Tableau N°22 : Activité des fractions de polarité croissante extraites des feuilles de *Faramaea guianensis* RUBIACEAE(J.J.D.G. 8834) sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis in vitro* :  
 modèle A = promastigotes en culture  
 modèle B = amastigotes infectant des macrophages de souris.

extraits testés	modèles expérimentaux					
		2mg/ml	1mg/ml	0.5 mg/ml	0.1mg/ml	0.01mg/ml
Extrait FG 7 A sol. > 10 mg/ml dans H2O	A Promastig. survivants %	95	99	100	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	100	100	100	100	100
fraction FG 8 A sol < 0.5mg/ml dans H2O	A Promastig. survivants %					
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %			(38)*	43	89
Fraction FG 8 B sol.= 1 mg/ml dans H2O	A Promastig. survivants %		56	75	91	93
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		87**	95**	95	98
Fraction FG 8 C sol.= 1mg/ml dans H2O	A Promastig. survivants %		53	100	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %			73	100	98
Fraction FG 8 D sol=1mg/ml dans H2O	A Promastig. survivants %		63	100	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		1	50	56	62
Fraction FG 8 E sol.=1mg/ml dans H2O	A Promastig. survivants %		56	100	100	100
	B Amastig. ntracell. I.S. Macrophages survivants %		3	64	65	79
			76	85	98	99

Tableau N°23 : Activité des fractions saponosidiques des feuilles de *Faramea guianensis* RUBIACEAE(JJDG 8834) sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis in vitro* :

modèle A = promastigotes en culture,

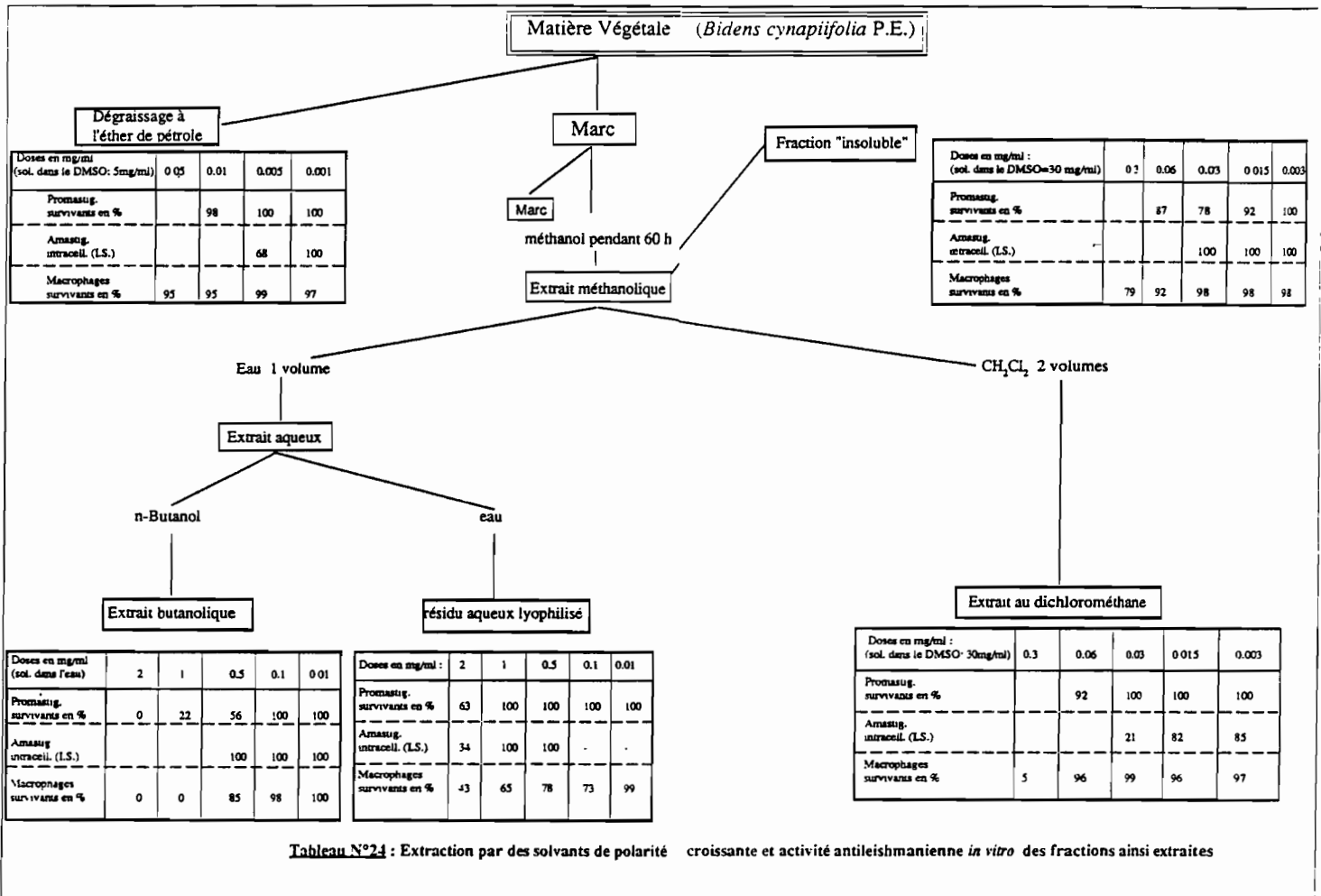
modèle B = amastigotes sur macrophages de souris.

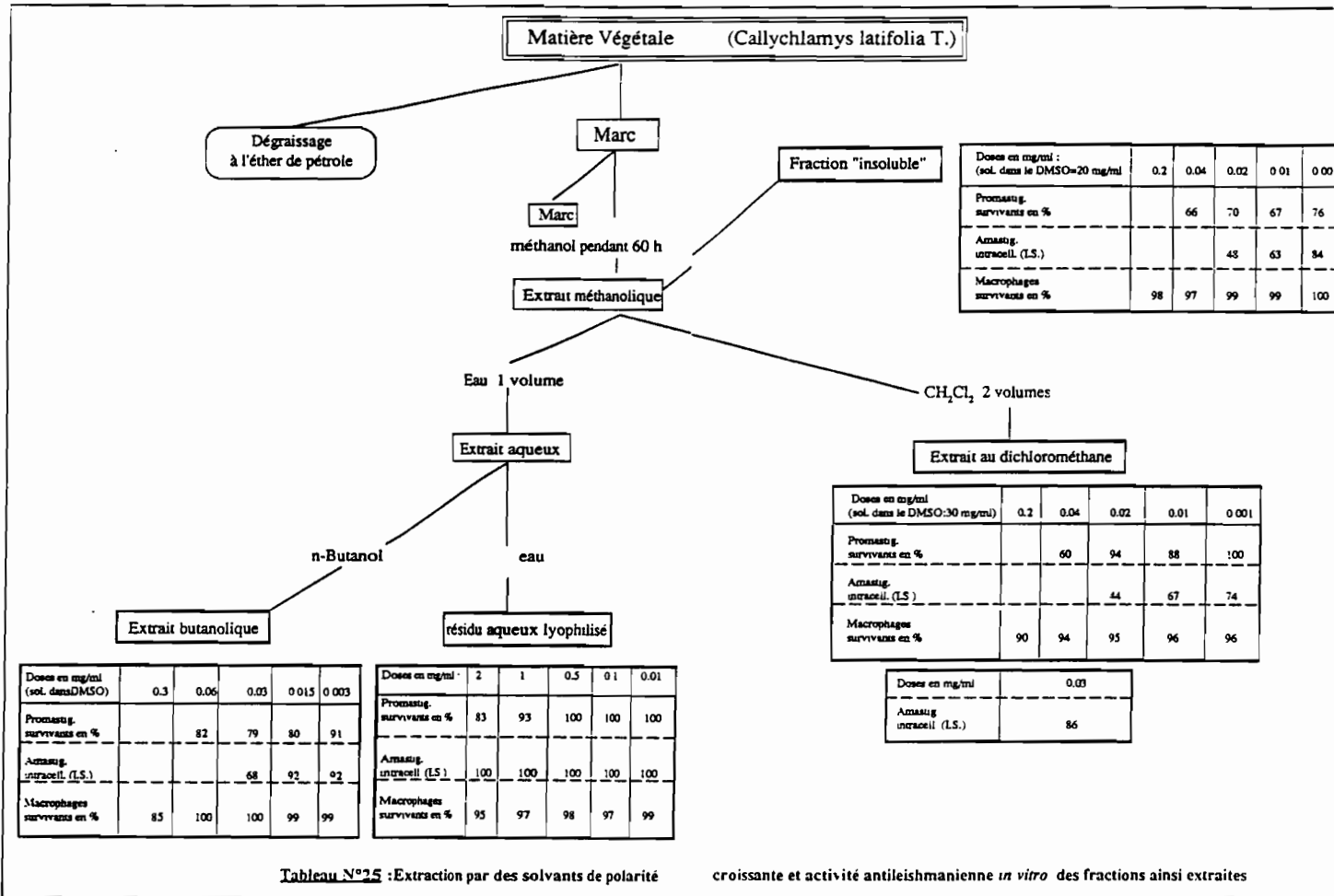
\* = 38 % de macrophages non platés dans une cupule, inhibition totale sur les deux autres cupules

\*\* = macrophages non platés ronds mais non colorés.

extraits testés	modèles expérimentaux	2mg/ml	1mg/ml	0.5 mg/ml	0.1mg/ml	0.01mg/ml
Fraction FG 8 G sol.< 30 mg/ml dans H2O	A Promastig. survivants %	85	82	100	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	1	<b>64</b>	49 <b>79</b>	65 <b>85</b>	96 <b>98</b>
Fraction FG 8 I sol.< 5 mg/ml dans H2O	A Promastig. survivants %	100	100	100	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	22	52 <b>80</b> 58	55 <b>98</b> 98	52 <b>100</b> 99	83 <b>100</b> 97
Fraction FG 8 K sol.> 10 mg/ml dans H2O	A Promastig. survivants %	100	100	100	100	100
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %	48 <b>80</b> 98	<b>100</b>	77 <b>100</b> 96	100 <b>100</b> 99	97

**Tableau N°23 (fin) : Activité des fractions saponosidiques des feuilles de *Faramaea guianensis* (RUBIA-CEAE) sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis in vitro*  
modèle A= promastigotes en culture,  
modèle B = amastigotes infectant des macrophages de souris.  
N.B. : les chiffres en gras correspondent à des séries de tests refaits**





Doses en mg/ml : (sol. dans le DMSO=20 mg/ml)	0.2	0.04	0.02	0.01	0.001
Promastig. survivants en %		66	70	67	76
Amastig. intracell. (I.S.)			43	63	84
Macrophages survivants en %	98	97	99	99	100

Doses en mg/ml (sol. dans le DMSO:30 mg/ml)	0.2	0.04	0.02	0.01	0.001
Promastig. survivants en %		60	94	88	100
Amastig. intracell. (I.S.)			44	67	74
Macrophages survivants en %	90	94	95	96	96

Doses en mg/ml	0.03
Amastig. intracell. (I.S.)	86

Doses en mg/ml (sol. dans DMSO)	0.3	0.06	0.03	0.015	0.003
Promastig. survivants en %		82	79	80	91
Amastig. intracell. (I.S.)			68	92	92
Macrophages survivants en %	85	100	100	99	99

Doses en mg/ml	2	1	0.5	0.1	0.01
Promastig. survivants en %	83	93	100	100	100
Amastig. intracell. (I.S.)	100	100	100	100	100
Macrophages survivants en %	95	97	98	97	99

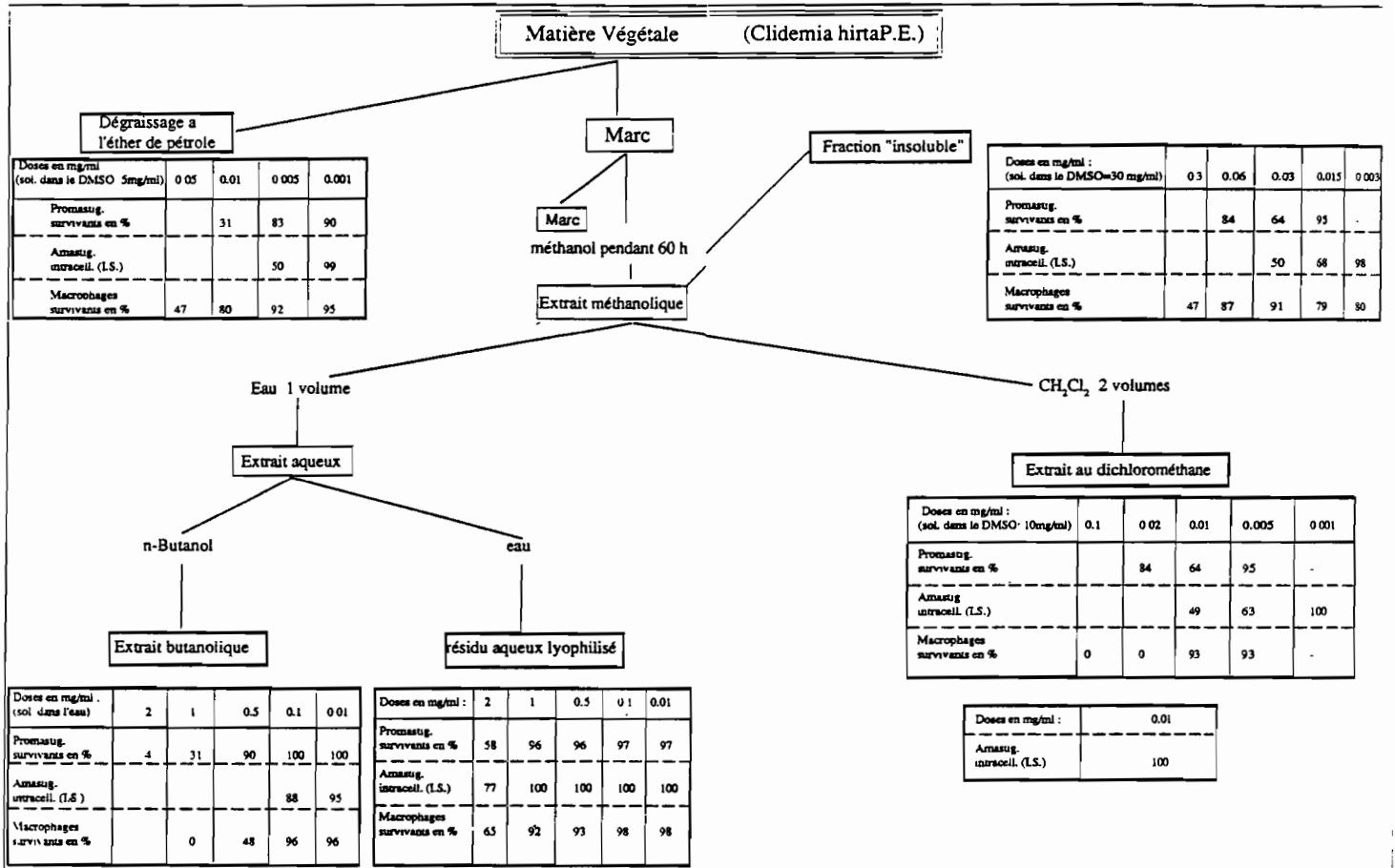
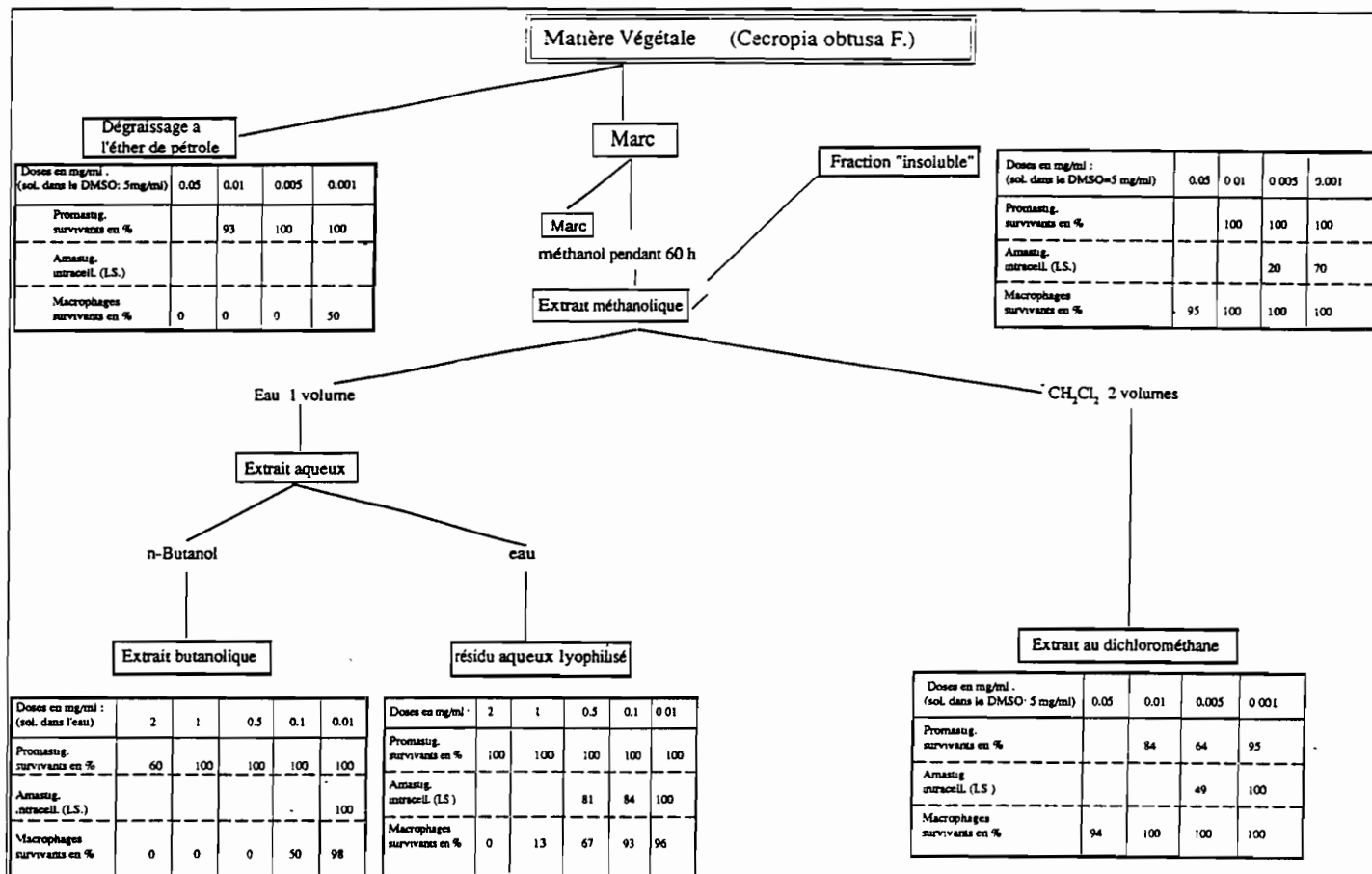
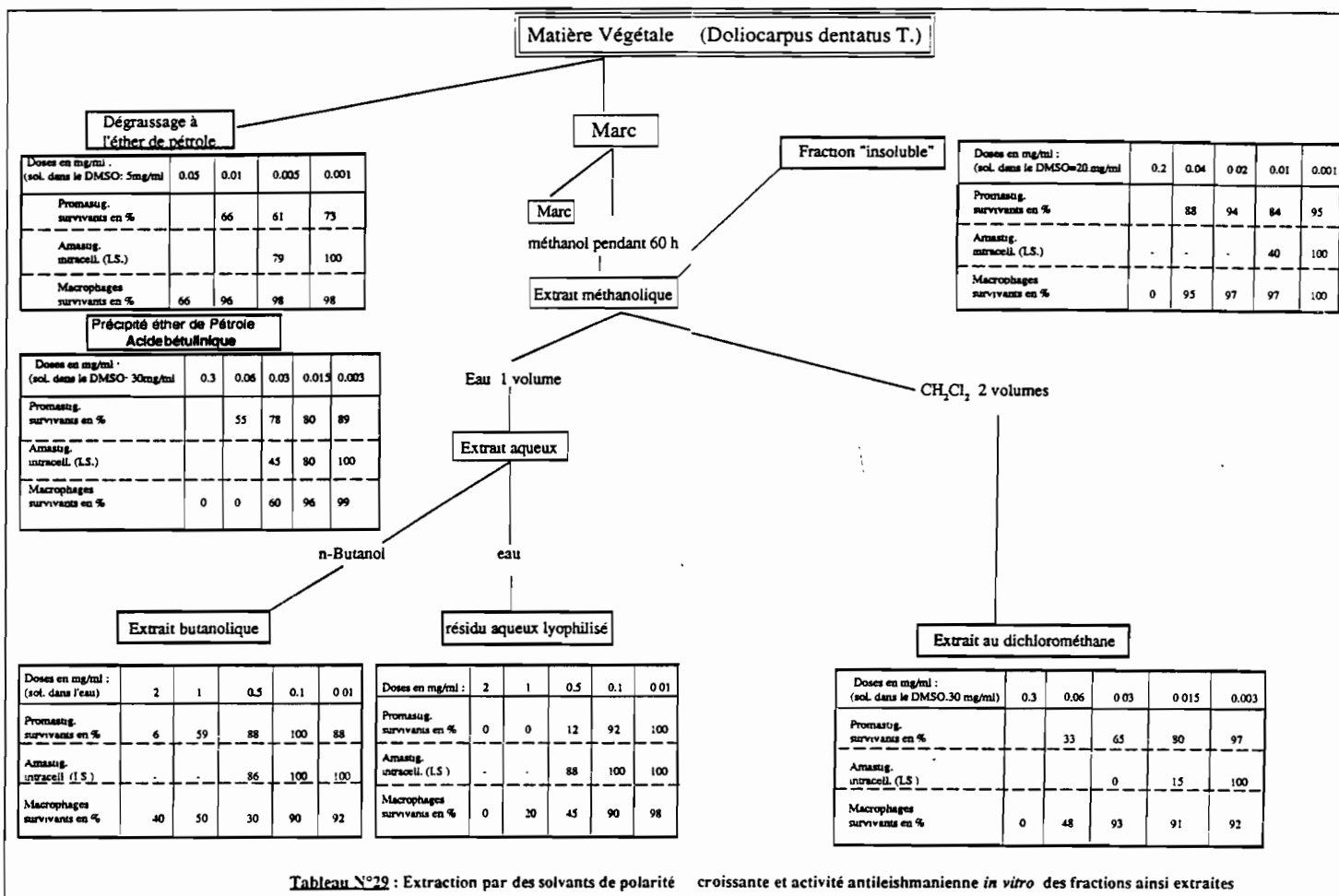
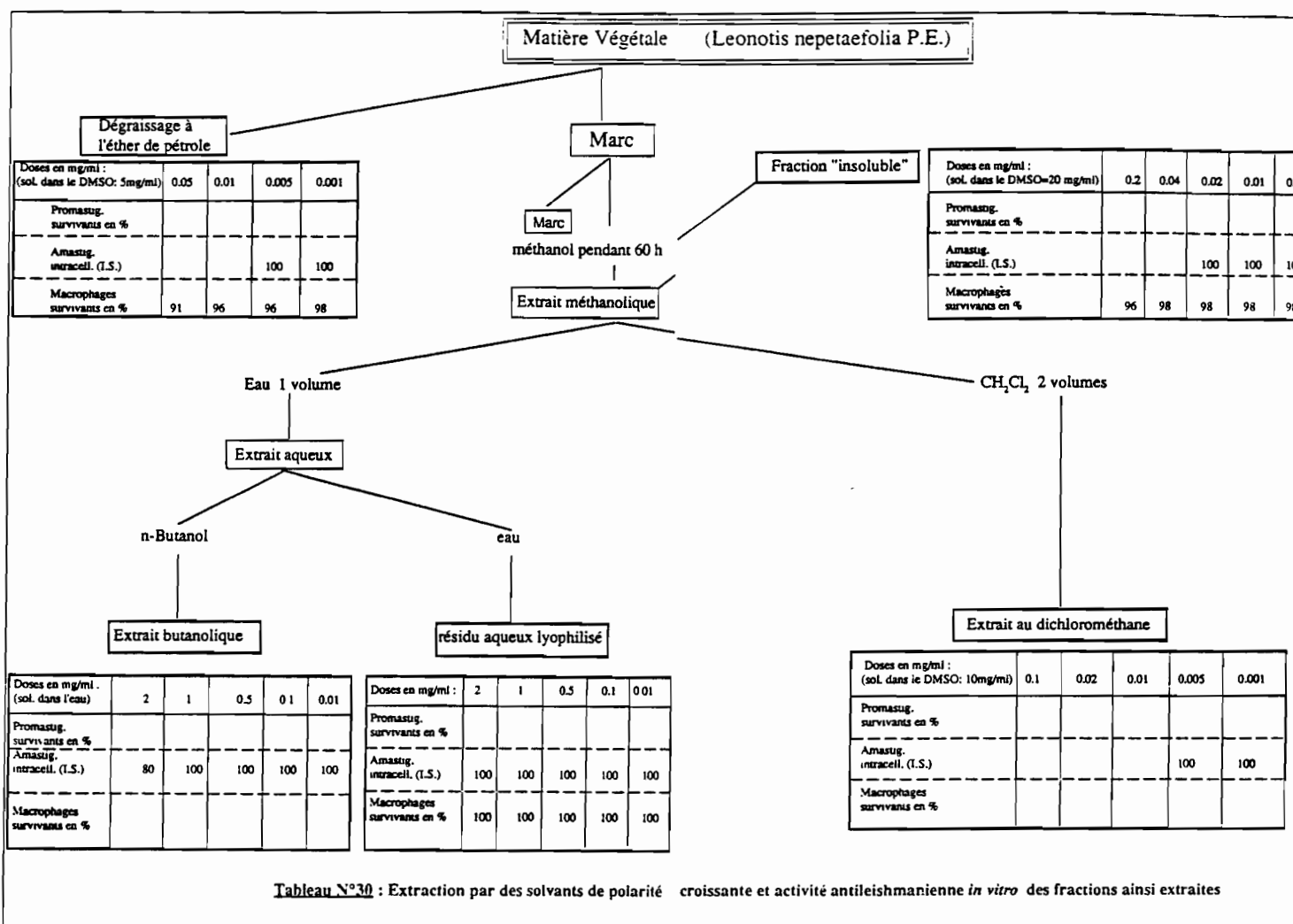


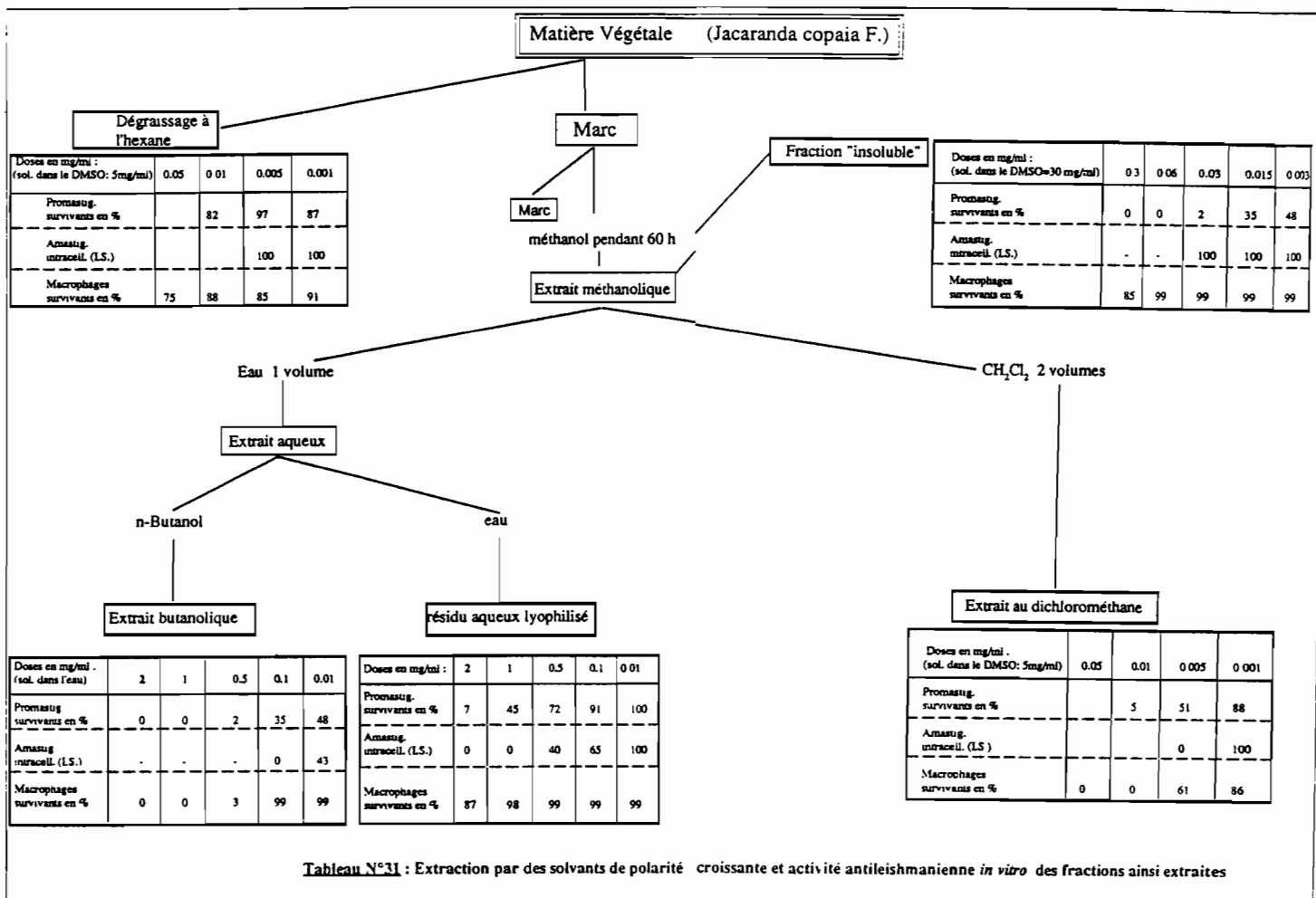
Tableau N°26 : Extraction par des solvants de polarité croissante et activité antileishmanienne *in vitro* des fractions ainsi extraites

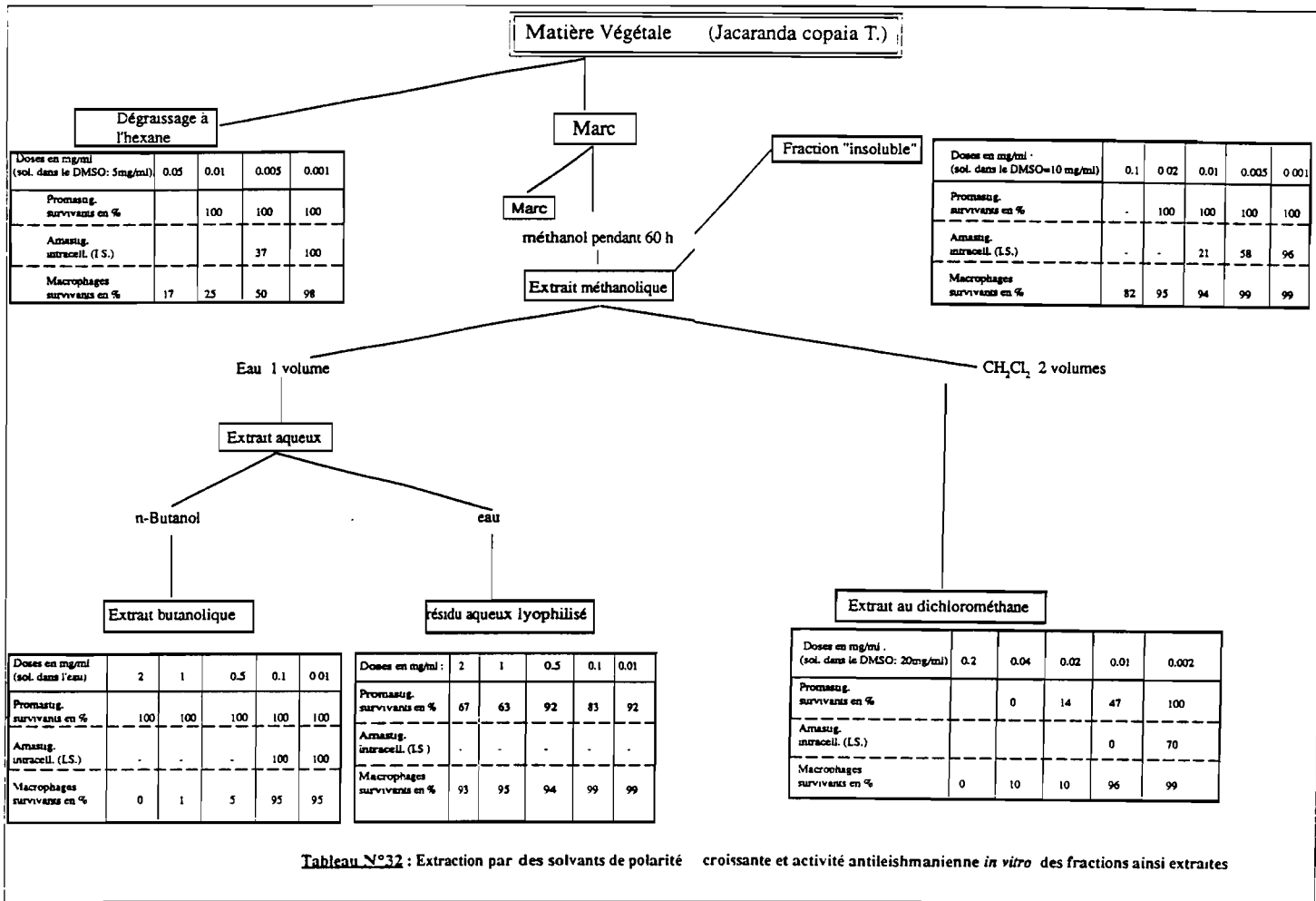


**Tableau N°27 :** Extraction par des solvants de polarité croissante et activité antileishmanienne *in vitro* des fractions ainsi extraites









extraits testés	modèles expérimentaux					
		2mg/ml	1mg/ml	0.5 mg/ml	0.1mg/ml	0.01mg/ml
Extrait FG 2 sol.à saturation =3mg/ml dans H2O	A Promastig. survivants %		0	17	71	
	B Amastig. intracell. I.S. Macrophages survivants %		-	-		
		0.05 mg/ml		0.01mg/ml		0.005 mg/ml
fraction FG 9 B sol =5mg/ml dans le DMSO	A Promastig. * survivants %			41		100
	B Amastig.*** intracell. I.S. Macrophages** survivants %			33		100
		81		73		97
						92
Fraction FG 9 D sol.= 5mg/ml B dans le DMSO	A Promastig. * survivants %			100		100
	B Amastig.*** intracell. I.S. Macrophages** survivants			58		100
		47		88		98
						98
		0.3	0.06	0.03	0.015	0.003 mg/ml
fraction FG 10 B sol = 30 mg/ml dans le DMSO	A Promastig. * survivants %		19	63	100	100
	B Amastig.*** intracell. I.S. Macrophages** survivants %			60	89	91
		0				
Fraction FG 10 C sol.= 30 mg/ml dans le DMSO	A Promastig. * survivants %		75	80	99	100
	B Amastig.*** intracell. I.S. Macrophages** survivants			94	95	97
		0				

Tableau N°33 : Activité des fractions des feuilles de *Faramea guianensis* RUBIACEAE(JJDG 8834) soluble dans le DMSO sur les modèles *Leishmania mexicana amazonensis* *in vitro*

modèle A= promastigotes en culture,

modèle B= amastigotes infectant des macrophages de souris.

\* concentration maximale tolérée en DMSO par les promastigotes = 0.2 %

\*\* concentration maximale tolérée en DMSO par les macrophages = 1 %

\*\*\* concentration maximale tolérée en DMSO par les amastigotes = 0.1 %

## 6. BIBLIOGRAPHIE

- 
- <sup>1</sup> ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (1978) : Soins de santé primaires : Rapport de la Conférence internationale sur les soins de santé primaires, Alma Ata, URSS, 6-12 septembre 1978, Genève 1978 (série "Santé pour tous").
- <sup>2</sup> ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (1978) : Promotion et développement de la médecine traditionnelle, Rapport d'une réunion de l'O.M.S., Genève, Rapport technique N°622, 43p.
- <sup>3</sup> GENTILINI M. ET DUFLO B.(1982) : Médecine tropicale, Flammarion, 682p.
- <sup>4</sup> Anonyme (1989) : La découverte du D.D.T., Pour la Science, N°140, p 21.
- <sup>5</sup> MAZIER D.(1988) : Le paludisme, la principale maladie parasitaire, *in* : "Santé et Médecine", La découverte/ORSTOM/INSERM, Paris, p 262
- <sup>6</sup> MANN J.: Réponses à une interview du directeur du programme SIDA à l'O.M.S., Le Monde, 4-5 juin 1989.
- <sup>7</sup> VALLIN J.(1988) : "De nombreux facteurs d'inégalité devant la mort" *in* :Santé et Médecine, Ed. La Découverte / ORSTOM / INSERM, Paris, p.18-23.
- <sup>8</sup> LEPelletier L., GAY F., NADIRE-GALLIOT M., POMAN J.P., BELLONY S., CLAUSTRE J., TRAORE B.M., ET MOUCHET J. : Le paludisme en Guyane : situation générale de l'endémie, communication à la Société Française de Pathologie Exotique, séance du 14 juin 1989.
- <sup>9</sup> SAUSSE A. : Populations primitives du Maroni (Guyane française), Institut Géographique National, Paris, 1951.
- <sup>10</sup> MOLEZ J.F.(1978) : Le paludisme des Broméliacées, D.E.A. d'Entomologie médicale et vétérinaire, Université de Paris XI.
- <sup>11</sup> MOUCHET J., NADIRE-GALLIOT M., GAY F., POMAN J.P., LEPelletier L., CLAUSTRE J. ET BELLONY S. : "Le paludisme en Guyane : II. Les caractéristiques des différents foyers et la lutte antipaludique", Bull.Soc.Path.Ex., **82**, 393-405.
- <sup>12</sup> TRAPE J.-F.(1985) : Lutte antipaludique en Guyane française: I. Problèmes actuels. Rapport remis au Conseil Général de la Guyane, non publié.
- <sup>13</sup> Observation personnelle

- 
- 14 RAMBAJAN I.(1988) : Reapparance of Unprecedented *falciparum* Malaria 28 years after the Last Casè in the Cuyuni Mazaruni-Potaro, Guyana, South America, Trop. Geographical Med., **40**, 269-271.
- 15 O.M.S.(1973), Rapport technique, N° 529, 128p.
- 16 TRAGER.W. ET JENSEN J.B.(1976) : Human Malaria Parasites in Continuous Culture, Science, **193**, 673-675.6
- 17 DESJARDINS R.E., CANFIELD C.J., HAYNES J.D., ET CHULAY J.D.(1979) : Quantitative Assessment of Antimalarial Activity *in vitro* by a Semi-automated Microdilution Technique, Antimicrob. Agents Chemother., **16**, 710-718.
- 18 VINCKE I.H., LIPS M.(1948) : Un nouveau *Plasmodium* d'un rongeur sauvage du Congo, *P. berghei* nv. sp., Annals Soc. belge Med. Trop., **28**, 97-104.
- 19 PETERS W.(1980) : Chemotherapy of Malaria, Academic Press, New York.
- 20 KILLICK-KENDRICK R., PETERS W.(1978) : Rodent Malaria, Academic Press, p 347.
- 21 DAVIDSON D.E., JOHNSEN D.O., TANTICHAROENYOS P., HICKMAN R.L., KINNAMON K.E.(1976) : Evaluating New Antimalarial Drugs against Trophozoite induced *Plasmodium cynolmogi* Malaria in Rhesus Monkeys, Am. J. Trop. Med. Hyg., **25**, 26-33.
- 22 SCHMIDT L.H.(1973) : Infections with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the Owl Monkey - Model Systems for Basic Biological and Chemotherapeutics Studies, Trans. Roy. Soc.Trop. Med. Hyg., **67**, 446-474.
- 23 FANDEUR T., DUBOIS P., GYSIN J., DEDET J.-P., PEREIRA DA SILVA L.(1984) : *In vivo* and *in vitro* Studies on Protective and Inhibitory Antibodies against *Plasmodium falciparum* produced in Infected *Saimiri sciureus* Monkeys, J. Immunol., **132**, 432-437.
- 24 HEIFFER M.H., DAVIDSON D.E., , KORTE D.W.(1984) : Preclinical Testing. *in*: Antimalarial Drugs, Vol. 1, p 351-373, Ed. PETERS W. ET RICHARDS W.H.G., Springer-Verlag, Berlin.
- 25 BRYSKIER A., LABRO M.T.(1988) : Paludisme et médicaments, Arnette, 276p
- 26 PELLETIER ET CAVENTOU(1820) : Recherches chimiques sur les quinquinas, Ann. Chim. Phys., **15**, 289-318 et 337-367.
- 27 STUIVER P.C., LIGTHELM R.J., GOUD T.J.L.M.(1989) : Acute Psychosis after Mefloquine, Lancet, N° 2, p282.

- 
- 28 WARHURST D.C., SCHOFIELD C.J. Ed. (1989) : Halofantrine in the Treatment of Multidrug-Resistant Malaria, *Suppl. Parasitology Today*, 84p.
- 29 DESJARDINS R.E., TRENHOLME G.M.(1984) : Antimalarial Chemotherapy, *in*: "Parasitic Diseases, Chemotherapy", p4, Ed.J.M. MANSFIELD, 490p.
- 30 WARHURST D.C.(1988): Mechanism of Chloroquine Resistance in Malaria, *Parasitology Today*, 4, 211-213.
- 31 DIAZ DE LEON A.(1937) : Primeros casos de paludismo tratados por un derivado de la sulfanilamida, *Bol. of Sanit. Panama*, 16, 1039-1040.
- 32 GAYRAL P.(1979) : Les antimalariques, *Lyon Pharmaceutique*, 30, 209-219.
- 33 O.M.S. (1981) : The Development of Qinghaosu and its Derivatives as Antimalarial Drugs. Rapport d'experts OMS, ref. TDR/CHEMAL-SWG(4)/(QHS)/81.3.
- 34 KEPLER J.A., PHILIP A., LEE Y.W., MUSALLAM H.A., CAROLL F.I.(1987) : Endoperoxydes as Potential Antimalarial Agents, *J. Med. Chem.*, 30,1505-1509.
- 35 VENNERSSTROM J.L.(1989) : Amine Peroxides as Potential Antimalarials, *J. Med. Chem.*, 32, 64-67.
- 36 O.M.S. (1986) : The Development of Artemisinin and its Derivatives : Report of a Meeting of the Scientific Working Group on the Chemotherapy of Malaria, Ref. TDR/CHEMAL-SWG(4) / ART / 86.3.
- 37 BROSSI A., VENUGOPALAN B., GERPE L.D., YEH H.J.C, FLIPPEN-ANDERSON J.L., BUCHS P., LUO X.D., MILHOUS W., PETERS W.(1988) : Artheether, a New Antimalarial Drug : Synthesis and Antimalarial Properties, *J. Med. Chem.*, 31, 645-650.
- 38 AVERY M.A., JENNINGS-WHITE C., CHONG W.K.M.(1987) : The Total Synthesis of (+) Artemisinin and (+) 9-Desmethylartemisinin, *Tetrahedron Letters*, 28, 4629-4632.
- 39 FIESER L.F., BERLINER E., BONDHUS F.J., CHANG F.C., DAUBEN W.G., ETTLINGER M.G., FAWAZ G., FIELDS M., FIESER M., HEIDEL-BERGER C., HEYMANN H., SELIGMAN A.M., VAUGHAN W.R., WILSON A.G., WILSON E., WU M., LEFFLER M.T., HAMLIN K.E., HATHAWAY R.J., MATSON E.J., MOORE E.E., MOORE M.B., RAPALA R.T., ZAUGG H.E.(1948) : I à VIII. Naphtoquinones Antimalarials., *J. Amer. Chem. Soc.*, 70, 3151-3237.
- 40 STECK E.(1972) *in*: "The Chemotherapy of Protozoan Diseases", Volume 3, sections 4-5, 23.216-23.220.

- 
- 41 SPENCER C.F., KONIUSKI F.R., ROGERS E.F., SHAVEL J., EASTON N.R., KACZKA A., KUEHL F.A., PHILLIPS R.F., WALTI A., FOLKERS K.(1947) : Survey of Plants for Antimalarial Activity, *J. Nat. Prod. (Llyodia)*, **10**, 145-174.
- 42 PHILLIPSON J.D., O'NEILL M.J.(1987) : Antimalarial and Amoebicidal Compounds from Plants, *Fitoterapia*, **58**, 336-337.
- 43 LINS BRANDAO M.DAS G., ANTUNES BOTELHO M. DA G., KRETTLI A. U.(1985) : Quimioterapia experimental antimalarica com produtos naturais: I. Uma abordagem mais racional, *Ciencia et Cultura*, **37**, 1153-1163.
- 44 BOURGET A.(1987) : Recherche de l'activité antipaludique des alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques d'une rutacée : *Ptelea trifoliata* L., Thèse de Doctorat en Pharmacie d'Etat, Tours.
- 45 ORNELAS H.M., DISTASI L.C., CURI P.R., SALATA E.(1987) : Efeito de plantas medicinais sobre a infeçao pelo *Plasmodium berghei* em camundongos, *Memorio del Instituto Oswaldo Cruz*, suppl. 82, Novembre, 25.
- 46 AMORIM C.Z., FLORES C.A., EVANGELHO GOMES B., MARQUES A.D.(1988) : Screening for Antimalarial Activity in the genus *Potomorphe*, *J. Ethnopharmacol.*, **24**, 101-106.
- 47 ETKIN N.L.(1981) : A Hausa Herbal Pharmacopoeia : Biomedical Evaluation of Commonly Used Plant Medicines, *J. Ethnopharmacol.*, **4**, 75-98.
- 48 CLARK I.A., EOWDEN W.B., HUNT N.H., MAXWELL L.E., MACKIE E.J.(1984) : Activity of Divicine in *Plasmodium vinckei* Infected Mice has Implication for Treatment of Favism and Epidemiology of G-6-PD-Deficiency, *Brit. J. Haematol.*, **57**, 479-487.
- 49 POPP F.D., WEFER J.M., CHAKRABORTY D.P., ROSEN G., CASEY A.C.(1968) : Investigations of African Plants for Alkaloids, Antimalarial Agents and Antineoplastic Agents, *Planta Medica*, **3**, 343-347.
- 50 OBIH P.O., MAKINDE M., LAOYE O.J.(1985) : Investigations of Various Extracts of *Morinda lucida* for Antimalarial Actions on *Plasmodium berghei berghei* in Mice, *African Med. med.Sci.*, **14**, 45-49.
- 51 MAKINDE J.M., OBIH P.O.(1985) : Screening of *Morinda* Leaf Extract for Antimalarial Action on *Plasmodium berghei berghei* in Mice, *Afr. J. Med. med. Sci*, **14**, 59-63.
- 52 DURODOLA J.I.(1974) : Anti-neoplastic Property of a Crystalline Compound Extracted from *Morinda lucida*, *Planta Medica*, **26**, 208-211.

- 53 HAKIZAMUNGU E., WERI M.(1988) : L'usage des plantes médicinales dans le traitement du paludisme en médecine traditionnelle, Bull. Méd. trad. Pharm., 2, 11-17.
- 54 GBEASSOR M., KOSSOU Y., DE SOUZA C., AMEGBO K., DENKE A., KOUMAGLO K.(1988) : Action de quelques plantes médicinales sur la croissance du *Plasmodium falciparum* *in vitro*, Bull. Méd. trad. Pharm., 2, 5-10.
- 55 GBEASSOR M., KOSSOU Y., AMEGBO K., DE SOUZA C., KOUMAGLO K., DENKE A.(1989) : Antimalarial Effects of Eight African Medicinal Plants, J. Ethnopharmacol., 25, 115-118.
- 56 MAKINDE J.M., AMUSAN O.O.G., ADESOGAN E.K.(1988) : The Antimalarial Activity of *Spathodea campanulata* Stem Bark on *Plasmodium berghei berghei* in Mice, Planta medica, 122-125.
- 57 XU R., SNYDER J.K., NAKANISHI K.(1984) : Robustadiol A and B from *Eucalyptus robusta*, J. Am. Chem. Soc., 106, 734-736.
- 58 QIN G.W., CHEN H.C., WANG H.C., QIAN M.K.(1981) : Acta Chim Sin., 39, 83.
- 59 CHEN Z.-L., WANG B., CHEN M.-Q.(1987) : Steroidal Bitter Principles from *Tacca plantaginea* Structures of Taccanolide A et B, Tetrahedron Letters, 28, 1673-1676.
- 60 WU T.-S., KUOH C.-S., FURUKAWA H.(1982) : Acridone Alkaloids from *Severinia buxifolia*, Phytochemistry, 21, 1771-1773.
- 61 FUJIOKA H., NISHIYAMA Y., FURUKAWA H., KUMADA N.(1989) : *In vitro* and *in vivo* Activities of Atalaphillinine and Related Acridone Alkaloids against Rodent Malaria, Antimicrob. Agents Chemother., 33, 6-9.
- 62 TRAGER W., POLONSKY J.(1981) : Antimalarial Activity of Quassinoids against Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro*., Am. J. Trop. Med. Hyg., 30, 531-537.
- 63 FANDEUR T., MORETTI C. ET POLONSKY J.(1985) : *In vitro* and *in vivo* Assessment of the Antimalarial Activity of Sergeolide, Planta Medica, 20-23.
- 64 BRAY D.H., O'NEILL M.J., BOARDMAN P., PHILLIPSON J.D., WHARHURST D.C.(1985): Structure Related *in vitro* Antimalarial Activities of some Quassinoids, Journ. Pharm. Pharmacol., 37 (suppl.), 142.
- 65 O'NEILL M.J., BOARDMAN P., K.L. CHAN, BRAY D.H., PHILLIPSON J.D., WARHURST D.C.(1985) : Antimalarial Activity of *Brucea javanica* Fruits, Journ. Pharm. Pharmacol., 37(suppl), 49.

- 66 O'NEILL M.J., BRAY D.H., BOARDMAN P., PHILLIPSON J.D., WARHURST D.C.(1986) Plants as Sources of Antimalarial Plants : *in vitro* Antimalarial Activities of some Quassinoids, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **30**, 101-104.
- 67 CHAN K.L., O'NEILL M.J., PHILLIPSON J.D., WARHURST D.C.(1986) : Plants as Sources of Antimalarial Drugs . Part 3 : *Eurycoma longifolia*, *Planta medica*, **2**, 105-107.
- 68 O'NEILL M.J., BRAY D.H., BOARDMAN P., CHAN K.L. ET PHILLIPSON J.D.(1987) : Plants as Sources of Antimalarial Drugs, Part 4. Activity of *Brucea javanica* Fruits against Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro* and against *Plasmodium berghei* *in vivo*, *J. Nat. Prod.*, **50**, 41-48.
- 69 O'NEILL M.J., BRAY D.H., BOARDMAN P., WRIGHT C.W., PHILLIPSON J.D.(1988) : Plants as Sources of Antimalarial Drugs, Part 6: Activities of *Simarouba amara* Fruits, *J. Ethnopharmacol.*, **22**, 183-190.
- 70 RILEY E.(1989) : Pre-Erythrocytic Stage Malaria Vaccine Development : Current Status and Future Prospects, *Parasitology Today*, **5**, 202-203.
- 71 BRISSET C. ET STOUFFLET J.(1988) *in*: Santé et Médecine, Editions La Découverte / ORSTOM / I.N.S.E.R.M., Paris, p 263.
- 72 MARR J.J.(1984) : The Chemotherapy of Leishmaniasis *in*: "Parasitic Diseases, the Chemotherapy" , **2**, Ed. MANSFIELD J.M., Marcel Dekker , New York.
- 73 LE PONT F.(1984) : Contribution à l'épidémiologie de la leishmaniose tégumentaire en Guyane française, Thèse de doctorat d'Université, Université de Paris XI.
- 74 ESTERRE P., CHIPAUX J.P., LEFAIT J.F., DEDET J.P.(1986) : Evaluation d'un programme de lutte contre la leishmaniose cutanée dans un village forestier de Guyane française, *Bull. World Health Org.*, **64**, 559-565.
- 75 ALEXANDRE D.-Y., DEDET J.-P., ESTERRE P.(1987, pub. 1988) : La leishmaniose en Guyane française. 7. Caractéristiques structurales de quelques sites de contamination humaine en forêt, *Cahiers ORSTOM Entomol. Méd. Parasitol.*, **25**, 101-109.
- 76 BERMAN J.D.(1985) : "Experimental Chemotherapy of Leishmaniasis" *in*: *Leishmaniasis*, Ed. CHANG K.P. ET BRAY R.S., Elsevier, 490 p.
- 77 BERMAN J.D. ET WYLER D.J. (1980) : An *in vitro* Model for Investigation of Chemotherapeutic Agents in Leishmaniasis, *J. Infect. Dis.*, **142**, 83-86.
- 78 NEAL R.A. ET MATTHEWS P.J.(1982) : *In vitro* Antileishmanial Properties of Pentavalent Antimonial Compounds, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Parasitol.*, **76**, 284.

- 
- 79 MATTOCK N.M. ET PETERS W. (1975) : The Experimental Chemotherapy of Leishmaniasis II. : The activity in Tissue Culture of some Antiparasitic and Antimicrobial Compounds in Clinical Use, *Ann. Trop. Med. Par.*, **69**, 359-371.
- 80 BERENS R.L. ET MARR J. (1979) : Growth of *Leishmania donovani* Amastigotes in a Continuous Macrophage-like Cell Culture, *J. Protozoology*, **26**, 45 -456.
- 81 LOOKER D.L. , MARTINEZ S., HORTON J.M. ET MARR J.J.(1986) : Growth of *Leishmania donovani* Amastigotes in the Continuous Human Macrophage Cell Line U937 : Studies of Drug Efficacy and Metabolism, *Infect. Dis.*, **154**, 323-327.
- 82 VANNIER-SANTOS M.A., PIMENTA P.F.P., SOUZA W. DE(1988) : Effects of Phorbol Ester on *Leishmania mexicana amazonensis* : an Ultrastructural and Cytochemical Study, *J. Submicr. Cytol. Pathol.*, **20**, 583-593.
- 83 TROTTER E.R., PETERS W. ET ROBINSON B.L.(1980) : The Experimental Chemotherapy of Leishmaniasis IV. The Development of a Rodent Model for Visceral Infection, *Ann. Trop. Med. Hyg.*, **74**, 127-138.
- 84 BJORVATN B. ET NEVA F.A.(1979) : Experimental Therapy of Mice infected with *Leishmania tropica* , *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **28**, 480-485.
- 85 HANSON W.L., CHAPMAN W.L. ET KINNAMON K.E.(1977) : Testing of Drugs for Antileishmanial Activity in Golden Hamsters Infected with *Leishmania donovani* , *Int. J. Parasitol.*, **7**, 443-447.
- 86 CHAPMAN W.L., HANSON W.L., WAITS V.B., KINNAMON K.E.(1979) : *Rev.Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **21**, 189-193.
- 87 MADINDOU T.J., HANSON W.L. ET CHAPMAN W.L.(1985) : Chemotherapy of Visceral Leishmaniasis (*Leishmania donovani* ) in the Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus* ), *Ann. Trop. Med. Par.*, **79**, 13-19.
- 88 WALTON B.C., HARPER J. ET NEAL R.A.(1983) : Effectiveness of Allopurinol against *Leishmania braziliensis panamensis* in *Aotus trivirgatus*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**, 46-50.
- 89 CHAPMAN W.L., HANSON W.L. ET HENDRICKS L.D.(1983) : Toxicity and Efficacy of the Antileishmanial Drug Meglumine Antimoniate in the Owl Monkey (*Aotus trivirgatus*), *Parasitology*, **69**, 1176-1177.
- 90 BERMAN J.D., GALLALEE J.F., GALLALEE J.V.(1988) : Pharmacokinetics of Pentavalent Antimony (Pentostam) in Hamsters, *Am. J. Top. Med. Hyg.*, **39**, 41-45.

- 
- 91 BERMAN J.D.(1988) : Chemotherapy for Leishmaniasis : Biochemical Mechanisms, Clinical Efficacy and Future Strategies, Rev. Infec. Dis., **10**, 560-586.
- 92 FALCOFF R., FALCOFF E., BRANDELY M., BADARRO R. : Conférence de presse du 24 juin 1989 à l'institut Curie à Paris. Article à paraître dans: New England Journal of Medecine.
- 93 BERENS R.L., MARR J.J., NELSON D.J. ET LA FON S.W.(1980) : Antileishmanial Effect of Allopurinol and Allopurinol Ribonucleoside on Intracellular Forms of *Leishmania donovani*, Biochem. Pharmacol., **29**, 2397-2398.
- 94 WALTON B.C., HARPER J. ET NEAL R.A.(1983) : Effectiveness of Allopurinol against *Leishmania braziliensis panamensis* in *Aotus trivirgatus*, Am. J. Trop. Med. Hyg., **32**(1), 46-50.
- 95 KAGER P.A., REES P.H., WELLDE B.T., HOCKMEYER W.T.ET LYERLY W.H.(1981) : Allopurinol in the Treatment of Visceral Leishmaniasis, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **75**, 556-559.
- 96 BERMAN J.D. ET WEBSTER H.K.(1982) : *In vitro* Effects of Mycophenolic Acid and Allopurinol against *Leishmania tropica* in Human Macrophages, Antimicrob. Agents Chemother., **21**, 887-891.
- 97 BERMAN J.D., HANSON W.D., CHAPMAN W.L., WAITS V.B., COX R.H.(1987) : Toxicity of Formycin B to Hamster and Dog, Parasitology, **73**, 1267-1268.
- 98 BERMAN J.D. (1981) : Activity of Imidazoles against *Leishmania tropica* in Human Macrophages Cultures, Am. J. Trop. Med. Hyg., **30**, 566-569.
- 99 BERMAN J.D., HOLZ G.G. ET BEACH D.H. (1984) : Effects of Ketoconazole on Growth and Sterol Biosynthesis of *Leishmania mexicana* Promastigotes in Culture, Mol. Biochem. Parasitology, **12**, 1-13.
- 100 URCUYO F.G. ET ZAIAS N.(1982) : Oral Ketoconazole in the Treatment of Leishmaniasis, Int. J. Dermatol., **21**, 414-416.
- 101 WEINRAUCH L., LIVISHIN R.ET EL-ON J. (1983) : Cutaneous Leishmaniasis : Treatment with Ketoconazole, Cutis, **21**(3), 288-289, 294.
- 102 KINNAMON K.E., STECK E.A., LOIZEAUX P.S., HANSON W.L., CHAPMAN W.L. ET WAITS V.B.(1978) : The Antileishmanial Activity of Lepidines, Am. J. Trop. Med. Hyg., **27**, 751-757.

- 
- 103 ALVING C.R., STECK E.A., CHAPMAN W.L., WAITS V.B. ET HENDRICKS L.D., SWARTZ G.M. ET HANSON W.L. (1978) : Therapy of Leishmaniasis : Superior Efficacies of Liposome Encapsulated Drugs, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 2959-2963.
- 104 BERMAN J.D. ET AIKAWA M. (1984) : Activity of Immunoglobulin G Coated Red Cell Ghosts Containing Pentamidine Against Macrophage-Contained *Leishmania in vitro* , Am. J. Trop. Med. Hyg., **33**, 1112-1118.
- 105 BERMANN J.D. ET GALLALEE J.V.(1985) : Antileishmanial Activity of Human Red Blood Cells Containing Formycin A, Infect. Dis., **151**, 698-703.
- 106 HUGHES H.P.A.(1988) : Oxidative Killing of Intracellular Parasites Mediated by Macrophages, Parasitology Today, **4**, 340-347.
- 107 FAIRLAMB A.H., BLACKBURN P., ULRICH P., CHAIT B.T., CERAMI A.(1985) : Trypanothione : a Novel bis(gluthathionyl)Spermidine Cofactor Reductase in Trypanosomatids, Science, **227**, 1485-1487.
- 108 BACCHI C.J.(1981) : Content, Synthesis, and Function of Polyamines in Trypanosomatids: Relationship to Chemotherapy, Protozoology, **28**, 20-27.
- 109 RABINOVITCH M., DEDET J.P., RYTER A., ROBINEAUX R., TOPPER G., BRUNET E.(1982) : Destruction of *Leishmania mexicana amazonensis* Amastigotes within Macrophages in Cultures by Phenazine Methosulfate and other Electron Carriers, J. Exper. Med., **155**, 415-431.
- 110 CROFT S.L., EVANS A.T. ET NEAL R.A. (1985) : The Activity of Plumbagin and other Electron Carriers against *Leishmania donovani* and *Leishmania mexicana amazonensis*, An. Trop. Med. Parasitol., **79**, 651-653.
- 111 RABINOVITCH M., ZILBERFARB V. ET RAMAZEILLES C.(1986) : Destruction of *Leishmania mexicana amazonensis* Amastigotes within Macrophages by Lysosomotropic Amino Acid Esters, J.Exp. Med., **163**, 520-535.
- 112 RABINOVITCH M., ZILBERFARB V., POUCHELET M.(1987) : *Leishmania mexicana* : Destruction of Isolated Amastigotes by Amino Acid Esters, Am. J. Trop. Med. Hyg., **36**(2), 288-293.
- 113 RABINOVITCH M.(1989) : Leishmanicidal Activity of Amino Acid and Peptide Esters, Parasitol. Today, **5**, 299-301.
- 114 WEINRYB I., CHASIN M., FREE C.A., HARRIS D.N., GOLDENBERG H., MICHEL I.M., PAIK V.S., PHILIPS M., SAMANIEGO S., HESS S.M.(1972) : Effects of Therapeutic Agents on Cyclic AMP Metabolism *in vitro*, Pharm. Sci., **61**, 1556-1567.

- 
- 115 WALTER R.D., BUSE E., EBERT F.(1978) : Effect of Cyclic AMP on Transformation and Proliferation of *Leishmania* Cells, *Tropenmedizin Parasitologie*, **29**, 439-442.
- 116 WALTER R.D.(1981) : Regulation of Cyclic AMP-Metabolism in *Leishmania* Promastigotes and Amastigotes, *in*: "The Biochemistry of Parasites", p151-167, Ed. G.M. SLUTZKY, Pergamon Press.
- 117 HANSEN B.D., CHIANG P.K., PEREZ-ARBELO J.(1986) : Evidence for a Membrane Adenosine Receptor in *Leishmania mexicana mexicana*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **195**, 547-551.
- 118 BACHRACH U., SCHNUR L.F., EL-ON J., GREENBLATT C.L., PEARLMAN E., ROBERT-GERO M., LEDERER E.(1980) : Inhibitory Activity of Sinefungin and Siba (5'-deoxy-5'-S - isobutylthioadenosine) on the Growth of Promastigotes and Amastigotes of Different Species of *Leishmania*, *FEBS Lett.*, **121**, 287-291.
- 119 PAOLANTONACCI P., LAURENCE F., ROBERT-GERO M.(1985) : Differential Effect of Sinefungin and its Analogs on the Multiplication of Three *Leishmania* Species, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **28**, 528-531.
- 120 LAWRENCE F., ROBERT-GERO M.(1986) : Recherche du mécanisme d'action de la sinéfungine, nucléoside antiparasitaire, chez *Leishmania*, *Bul. Soc. Franc. Parasitol.*, **4**, 193-196.
- 121 NEAL R.A., CROFT S.J., NELSON D.J.(1985) : Antileishmanial Effects of Allopurinol Ribonucleoside and the Related Compounds, Formycin B, Sinefungin and the Lepidine WR 6026, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **79**, 122-128.
- 122 ROBERT-GERO M. : Communication à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS) Gif sur Yvette, avril 1989.
- 123 ROBERT-GERO M., BACHRACH U., BHATTNAGAR S., POLONSKY J.(1985) : Inhibition *in vitro* de la croissance des promastigotes de *Leishmania donovani* par des quassinoides, *C.R. Acad. Sci.*, 300, série II, 803-806.
- 124 EVANS A.T., CROFT S.L.(1987) : Antileishmanial Activity of Harmaline and Other Tryptamine Derivatives, *Phytotherapy Research*, **1**, (1), 25-27.
- 125 SCHIFF P.L.(198 ) : The *Thalictrum* alkaloids : Chemistry and Pharmacology, *in*: "Alkaloids : Chemical and Biological Perspectives", vol. 5, p.363-366, Ed. PELLETIER S.W. , John Wiley and Sons, New York.
- 126 GHOSH A.K., BHATTACHARYA F.K., GHOSH D.K.(1985) : *Leishmania donovani* : Amastigotes Inhibition and Mode of Action of Berberine, *Experimental Parasitology*, **60**, 404-413.

- 
- 127 FOURNET A., MUNOZ V., MANJON A.M., ANGELO A., HOCQUEMILLER R., CORTES D., CAVE A., BRUNETON J.(1988) : Activité antiparasitaire d'alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiques. I. : Activité *in vitro* sur des promastigotes de trois souches de *Leishmania*, J. Ethnopharmacol., **24**, 327-335.
- 128 LASSERE G.(1979) : Atlas des départements d'Outre-Mer. 4. La Guyane, Ed. Centre d'Etude de Géographie Tropicale (CNRS) / ORSTOM. 36 planches.
- 129 GREHAND P., MORETTI C., JACQUEMIN H.(1987) : Pharmacopées Traditionnelles de Guyane (Créole, Wayāpi, Palikur), Editions de l'ORSTOM, Paris, 569 p.
- 130 R. PRICE (1983) : First time, the Historical Vision of an Afro-American People, The John Hopkins University Press, 189p.
- 131 DONICIE A., VOORHOEVE J.(1963) : De Saramakaanse woordenschat, Bureau voor Taalonderzoek in Suriname van de Universiteit van Amsterdam, 117 p.
- 132 DE GROOT A.(1975-1981) : Woordregister : Nerderlands-Saramakaans et Saramakaans-Nederlands, Instituut voor Taalwetenschap, Paramaribo, 2 vol., 377 p. et 128 p.
- 133 PRICE R.(1975) : Kikoongo and Saramaccan, a reappraisal, Bijdragen tot de Taal-, land-en Volkenkunde van Nederlandsch Indië, **131**, 461-478.
- 134 CHIVA M.(1985) : Le doux et l'amer, Presses Universitaires de France, Paris, 243 p.
- 135 JANSSEN JF.(1961) : The Health of Maroon Children of Surinam, J. Trop. Ped., December, 91-99.
- 136 JAMET P.(Dr.), communication personnelle.
- 137 CREMERS G., C. FEUILLET, GRANVILLE DE J.-J., HOFF M.(1988) : Liste des espèces de Phanérogames et de Ptéridophytes de Guyane française d'après l'herbier du centre ORSTOM de Cayenne (CAY), ORSTOM Cayenne, 54p.
- 138 HOFF M., BRISSE H.(1985) : Mise en place d'une base de données en botanique tropicale.1.Informatisation des échantillons d'herbier, Information-Documentation technique ORSTOM, **65**, 1-48.
- 139 SOTO A.A., BRAY D.H., PHILLIPSON J.D., WARHURST D.C.(1980) : *In vitro* Testing of Quinine, Quinidinone and Quinicine for antimalarial and cytotoxic activities, J. Pharm. Pharmac., Suppl., 40P.
- 140 PARIS R.R. ET MOYSE H.(1971) : Précis de Matière Médicale, **3**, p. 341, Ed. Masson, Paris.

- 
- 141 O'NEILL M.J., BRAY D.H., BOARDMAN P., PHILIPSON J.D., WARHURST D.C.(1985) : Plants as Sources of Antimalarial Drugs. Part 1. *In vitro* Test for the Evaluation of Crude Extracts from Plants, *Planta Medica*, **5**, 394-398.
- 142 FOURNET A., communication personnelle.
- 143 CHANG K.-P., HENDRICKS L.D.(1985) : Laboratory Cultivation and Maintenance of *Leishmania*, in: "Leishmaniasis", p. 213-244, Ed. CHANG K.P. AND BRAY R.S., Elsevier, 490 p.
- 144 MARR J.J.(1984) : The Chemotherapy of Leishmaniasis, in: "Parasitic Diseases, 2, p.206, Ed. J.M. MANSFIELD, Marcel Dekker.
- 145 GUERRIN M.(1986) : Etude de l'activité antileishmanienne, *in vitro*, d'extraits de diverses plantes utilisées en médecine traditionnelle en Guyane française, Thèse de Doctorat en médecine, Montpellier, 83 p.
- 146 NEAL R.A., CROFT S.L.(1984) : An *in vitro* System for Determining the Activity of Compounds against the Intracellular Amastigote Form of *Leishmania donovani*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **14**, 463-475.
- 147 BERMAN J.D. ET LEE L.S.(1984) : Activity of Antileishmanial Agents against Amastigotes in Human Monocyte-Derived Macrophages and in Mouse Peritoneal Macrophages, *J. Parasitol.*, **70**, 220-225
- 148 BRAY R.S., ALEXANDER J.(1987) : *Leishmania* and the Macrophage, in:"The Leishmaniasis", **1**, p 226-227, Academic Press, Londres.
- 149 RABINOVITCH M., communication personnelle.
- 150 DUTZ W., BASHARDOST M.Z., KINDMARK C.O., AGERWAL N.K., BENTLEY G.(1987) : Topical Therapy of Cutaneous Leishmaniasis with 2% Ketoconazole Ointment and DMSO, *Mitteilung der Osterreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin*, **9**, 179-185.
- 151 MATTOCK N.M. ET PETERS W. (1975) : The Experimental Chemotherapy of Leishmaniasis, III : Detection of Antileishmanial Activity in Some New Synthetic Compounds in a Tissue Culture Model, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **69**, 449-462.
- 152 STILL W.C., KAHN M., MITRA A.(1973) : Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution, *J. Org. Chem.*, **43**, 2923-2925.
- 153 DEDET J.-P., communication personnelle.
- 154 GYSIN J., CRENN Y., PEREIRA DA SILVA L., BRETON C.(1987) : d'après "Infos Recherche et Technologie", Mars 1987, Ed. CRESTIG Guyane.

- 
- 155 DEDET J.P., communication personnelle.
- 156 PEDREIRA LAPA BAUTISTA A.R., MORS W.B.(1975) : Estudo Fitoquímico de *Andira humilis* Mart. ex Benth. I. : Biochanina-A, o principal constituinte do órgão subterrâneo, B.IBB, 14, 58-63.
- 157 BRAZ FILHO R., GOTTLIEB O.R., VIERA PINHO S.L., QUEIROZ MONTE F.J., DA ROCHA A.I.(1973) : Flavonoids from Amazonian Leguminosae, *Phytochemistry*, 12, 1184-1186.
- 158 PELTER A., AMENECHI P.I.(1969) : Isoflavonoid and Pterocarpinoid Extractives of *Lonchocarpus laxiflorus*, *J. Chem. Soc.(C)*, 887-896.
- 159 ROBLOT F., HOCQUEMILLER R., JACQUEMIN H., CAVE A.(1978) : Alcaloïdes des Annonacées 2A : Alcaloïdes de *Dugetia calycina* Benoist, Annonacée guyanaise, *Plantes médicinales et phytothérapie*, 12, 259-266.
- 160 GOTTLIEB O.R., MAGALHAES A.F., MAGALHAES E.G., MAIA J.G.S., MARSAIOLI A.J.(1978) : Oxoaporphine Alkaloids from *Dugetia eximia* Diels, *Phytochemistry*, 17, 837-838.
- 161 LEBOEUF M., CAVE A., BHAUMIK P.K., MUKHERJEE B., MUKHERJEE R.(1982) : The Phytochemistry of the Annonaceae, *Phytochemistry*, 21, 2783-2813.
- 162 GHOSAL S., SAINI K.S., RAZDAN S.(1985) : *Crinum* Alkaloids : their Chemistry and Biology, *Phytochemistry*, 24, 2141-2156.
- 163 MAC LEAN D.B.(1968) : The *Lycopodium* Alkaloids, in : "The Alkaloids, Chemistry and Physiology", 10, p.372-378, Ed. R.H.F. MANSKE, Academic Press.
- 164 TAYLOR S.E., EDWARDS M., WILLIAMSON E., EVANS F.J.(1981) : The Sapintoxins : Nitrogen Containing Phorbols of Pharmacological Interest, *J. Pharm. Pharmacol.*, 54.
- 165 THYAGARAJAN S.P.(1989) : Treatment of Hepatitis-B Virus Carriers by *Phyllanthus amarus*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 43, 391.
- 166 MESTER I.(1973) : The Occurrence of the Alkaloids in Rutaceae, *Fitoterapia*, 44, 123-152.
- 167 HOCQUEMILLER R., CAVE A., FOURNET A.(1984) : La saülatine, alcaloïde isoquinoléique original isolé de *Abuta bullata*, *J. Nat. Prod.*, 47, 539-540.
- 168 PEDREIRA LAPA BAUTISTA A.R., MORS W.B.(1975) : Estudo Fitoquímico de *Andira humilis* Mart. ex Benth. II. : toxicidade dos extratos do órgão subterrâneo, B.IBB, 14, 64-77.

- 
- 169 PEDREIRA LAPA BAUTISTA A.R., ANTUNES LACAZ M.H., MORS W.B.(1975) : contribuição ao estudo de plantas toxicas no estado da Bahia : atividade de *Andira anthelmia* (Vell.) MacBr., B.IBB, **15**, 31-36.
- 170 DAVIOUD E.(1984) : A la recherche des plantes médicinales au coeur de l' Amazonie guyanaise, Rapport de stage, Faculté de Pharmacie de l'Université Lille II, non publié.
- 171 FERRARI F., DELLE MONACHE G., ALVES DE LIMA R.(1985) : Two Naphtopyran Derivatives from *Faramea cyanea*, *Phytochemistry*, **24**, 2753-2755.
- 172 N'DOUNGA M., BALANSARD G., BABADJAMIAN A., TIMON DAVID P., GASQUET M.(1983) : Contribution à l'étude de *Bidens pilosa* L.. Identification et activité antiparasitaire de la phényl-1heptatriyne-1,3,5, *Plantes médicinales et phytothérapie*, **17**, 64-75.
- 173 VIDRIO H., GARCIA-MARQUEZ F., REYES J., SOTO R.M.(1982) : Hypotensive Activity of *Cecropia obtusifolia*, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 475-476.
- 174 KUBITZKI K.(1968) : Flavonoids and Systematics of the Dilleniaceae, *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **81**, 238-251.
- 175 SASHIDA Y., YAMAMOTO T., KOIKI C., SHIMOMURA H.(1976) : A New Flavan Glycoside from *Buckleya lanceolata* Leaves, *Phytochemistry*, **15**, 1185-1186.
- 176 OKAMOTO A., OZAWA T., IMAGAWA H., ARAI Y.(1986) : Flavans from the Pith of Sago Palm, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1655-1656.
- 177 SWEENEY J.G., IACOBUCI G.A.(1977) : Synthesis of Anthocyanidins-II : the Synthesis of 3-Deoxyanthocyanidins from 5-Hydroxy-Flavanones, *Tetrahedron*, **33**, 2927-2932.
- 178 ELLIGER C.A.(1985) : Deoxygenation of Aldehydes and Ketones with Sodium Cyanoborohydride, *Synth. Comm.*,**15**, 1315-1324.
- 179 BATCHELOR J.F., BAUER D.J., HODSON H.F., SELWAY J.W.T., YOUNG D.A.B.(1979): Flavans and Pharmaceutical Compositions Containing them, *Brevet européen* **4,579**, 17 octobre 1979.
- 180 BATCHELOR J.F., BAUER D.J., HODSON H.F., SELWAY J.W.T., YOUNG D.A.B.(1984): Amino-Substitued Flavans Useful as Anti-Viral Agents, *Brevet U.S. N°* **4,461,907**, 24 juillet 1984.
- 181 BUDZIKIEWICZ H., WILSON J.M., DJERASSI C.(1963) : Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems.XXXII. Pentacyclic Triterpenes, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3688-3699.

- 
- 182 SHOLICHIN M., YAMASAKI K., KASAI R., TANAKA O.(1980) :  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance of Lupane-Type Triterpenes, Lupeol, Betulin and Betulinic acid, Chem. Pharm. Bull., **28**, 1006-1008.
- 183 Anonyme(1985) : Nat Prod.Rep., **2**(1), p9
- 184 LAPREVOTE O.(1989) : Alcaloïdes, lignanes et acétogénines de quatre Annonacées: *Unonopsis spectabilis*, *Rollinia mucosa*, *R. exsucca* et *R. ulei*., Thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud.
- 185 PELTER A.(1967) : The Mass Spectra of Oxygen Heterocycles. Part IV. The Mass Spectra of some Complex Lignans, J. Chem. Soc., (C), 1376-1380.
- 186 MACRAE W., NEIL TOWERS G.H.(1984) : Biological Activities of Lignans, Phytochemistry, **23**, 1207-1220.
- 187 NIKAIDO T., OHMOTO T., KINOSHITA T., SANKAWA, NISHIBE S., HISADA S.(1981) : Inhibition of Cyclic AMP Phosphodiesterase by Lignans, Chem. Pharm. Bull., **29**, 3586-3592.
- 188 OGURA M., CORDELL G.A., FARNSWORTH N.R.(1977) : Potential Anticancer Agents IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae), J. Nat. Prod., **40**, 157-168.
- 189 OGURA M., CORDELL G.A., FARNSWORTH N.R.(1977) : Jacoumaric Acid, a New Triterpene Ester from *Jacaranda caucana*, Phytochemistry, **16**, 286-287.
- 190 BRUNETON J.(1987) : Eléments de phytochimie et de pharmacognosie, Lavoisier, Paris, 585 p.
- 191 ANONYME(1986) : Molecular Biology of *Leishmania*, Parasitology Today, **2**, 45-53.
- 192 OGURA M., CORDELL G.A., FARNSWORTH N.R.(1976) : Potential Anticancer Agents. III. Jacaranone, a Novel Phytoquinoid from *Jacaranda caucana*, J. Nat. Prod., **39**, 255-257.
- 193 FARNSWORTH N.R., CORDELL G.A., OGURA M.(1976) : Phytoquinoid named Jacaranon, Brevet U.S. N° 68 90 96 , 24 mai 1976.
- 194 KUNESCH G., WESSELY F.(1965) : Notiz zur Oxydation des 2,4-dimethyl-6-nitrophenol mit Bleitetraacetat und zur Reaktivität des entsprechenden o-Chinolacetates, Monatsh. Chem., **96**, 1291-1295.
- 195 KUNESCH G., WESSELY F.(1965) : Über die Einwirkung von Semicarbazid auf Chinolacetate, Monatsh. Chem., **96**, 1315-1323.

- 
- 196 KUNESCH G., WESSELY F.(1965) : Über die Einwirkung von Thiolen und Sulfinsäuren auf Chinolacetate, 3. Mitt., Monatsh. Chem., **96**, 1547-1553.
- 197 GRADY R.W., BLOBSTEIN S.H., MESHNICK S.R., ULRICH P.C., CERAMI A., AMIRMOAZZAMI J., HODNETT E.M.(1984) : The *in vitro* Trypanocidal Activity of N-Substitued p-Benzoquinones Imines : Assessment of Biochemical Structure-Activity Relationships using the Hansch Approach, J. Cell. Biochem., **25**, 15-29.
- 198 PAHN DE E.M., MOLINA PORTELAM.P., STOPPANI A.O.M.(1988) : Efecto de quinonas y nitrofuranos sobre *Trypanosomas mega* y *Crithidia fasciculata*, Rev. Argentina Microb., **20**, 107-118.
- 199 CATLIN J.C., DOYLES DAVES G., FOLKERS K.(1971) : New Substitued 2,3-Dimethoxy-1,4-Benzoquinones as Inhibitors of Coenzyme Q Systems, J.Med. Chem., **14**, 45-48.
- 200 SCHNUR L., BACHRACH U., BAR-AD G., HARAN M., TASHMA Z., TALMI M., KATZLENDER J.(1983) : The Effect of Diaminoalkyl-Anthraquinone Derivatives on the Growth of the Promastigotes of *Leishmania tropica minor*, *L.t.major* and *L. aethiopica*, Biochem. Pharmacol., **32**, 1729-1732
- 201 FANDEUR T., communication personnelle.
- 202 GYSIN J., FANDEUR T.(1983) : *Saimiri sciureus* (karyotype 14-7) : an Alternative Experimental Model of *Plasmodium falciparum* Infection, Am. J. Trop. Med. Hyg., **32**, 461-467.
- 203 PETERS W., TROTTER E.R., ROBINSON B.L.(1974) : The Experimental Chemotherapy of Leishmaniasis 7. Drugs Responses of *Leishmania major* and *Leishmania mexicana amazonensis* with an Analysis of Promising Chemicals Leads to New Antileishmanial Agents, Annals Trop. Med. Hyg., **74**(3), 321-335.
- 204 Technique du Laboratoire d'Immunologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Paris (Dir. M. Rabinovitch) transmise par C. Ramazeilles.
- 205 BANERJI N., MAJUMDER P., DUTTA N.L.(1975) : A New Pentacyclic Triterpene Lactone from *Dillenia indica*, Phytochemistry, **14**, 1447-1448.
- 206 ZHONG S.-M., WATERMAN P.G., JEFFREYS J.A.D.(1984) : Naphtoquinones and Triterpenes from African *Diospyros* Species, Phytochemistry, **23**, 1067-1072.