

N° d'Ordre :

50376  
1996  
202

UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THESE DE DOCTORAT

présentée à l'Université de LILLE I  
pour l'obtention du titre de  
**Docteur en Sciences de la vie et de la santé**  
option: Immunologie

par

**Rodolfo FERNANDEZ-GOMEZ**

*Trypanosoma cruzi* : contribution à l'identification de substances  
chimiques et naturelles ayant une activité trypanocide

Présentée le 2 Octobre 1996 devant la commission d'examen

Membres du jury :

|               |  |
|---------------|--|
| Président :   | Professeur A. DHAINAUT   |
| Rapporteurs : | Docteur E. DEI-CAS<br>Docteur D.AFCHAIN                                |
| Examineurs :  | Professeur A. CAPRON<br>Professeur C. SERGHERART<br>Docteur A. OUAISSI |



S

*Je dédie ce travail  
à la mémoire de mon père  
et  
de ma grand-mère, Eugenia*



L'ensemble de ce travail a été réalisé au

**Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire,**  
Unités INSERM 167 et 415

à

**l'Institut Pasteur de Lille**

dirigé par

Monsieur le Professeur **André CAPRON**

et plus particulièrement dans le

**Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomatidés**  
sous la direction scientifique du  
**Dr. Ali OUAISSI**

---

---

## Remerciements

Ce mémoire est pour moi l'occasion de remercier le Professeur **André CAPRON** de m'avoir accueilli au sein du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire à l'Institut Pasteur de Lille. Veuillez accepter dans ce travail le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Au Docteur **Ali OUAISSI**, vous m'avez accepté au sein de votre équipe de recherche sur les Trypanosomatidés, et vous avez suivi ce travail avec patience et soutien.

Aux Docteurs **Daniel AFCHAIN** et **Eduardo DEL-CAS**, je suis honoré de pouvoir bénéficier de votre compétence et je tiens à vous remercier de l'attention que vous avez portée à l'achèvement de ce travail, à votre disponibilité et à vos conseils.

Au Professeur **Christian SERGHERART**, je vous suis très reconnaissant d'avoir suivi ce travail avec beaucoup de disponibilité et de gentillesse.

A Monsieur le Professeur **A. DHAINAUT**, vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse et je tiens à vous exprimer mes plus sincères remerciements.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire de recherche sur les Trypanosomatidés Messieurs Marco, Ali Taibi, Angel, Ralf, Billel et à Madame Billaut-Mulot.

Enfin, je suis très reconnaissant et jamais je ne vous oublierai, Zou, Nath (Juliette), Nath (Natacha), Vinca (20-K), Esteban (el Che), Hector, Petit Manu, Francky (Pelican-can-can), Kader, Christine, Cécile, Marina, Loïc (ta bibliothèque!), Momo et plus récemment à David (3D). Un grand merci à Jamal pour l'accueil dans son nouveau laboratoire (ex-mien) et à tous les membres du CIBP qui d'une façon ou d'une autre m'ont aidé pendant ces 4 années.

---



# Table des Matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. Introduction.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>A. Maladie de Chagas.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1. Agent pathogène.....   | 2         |
| a) Aspects historiques.....   | 2         |
| b) Taxonomie.....   | 3         |
| c) Cycle biologique.....  | 5         |
| d) Stades parasitaires.....   | 7         |
| e) Souches.....   | 8         |
| 2. Vecteurs.....  | 10        |
| 3. Réservoirs.....  | 11        |
| 4. Epidémiologie.....   | 13        |
| a) Distribution géographique.....   | 13        |
| b) Modes de transmission.....   | 15        |
| 5. Aspects cliniques.....   | 15        |
| a) Phase aiguë.....   | 16        |
| b) Phase indéterminée.....  | 18        |
| c) Phase chronique.....   | 18        |
| (1) Cardiomyopathie chagastique.....  | 18        |
| (2) Viscéropathie chagastique.....  | 19        |
| (3) Neuropathie chagastique.....  | 19        |
| 6. Aspects immunologiques de l'infection chagastique.....                                       | 20        |
| a) Manifestations immuno-pathologiques et activation polyclonale<br>des lymphocytes T et B..... | 21        |
| (1) Lymphocytes T.....  | 21        |
| (2) Lymphocytes B.....  | 22        |
| b) Pathologie autoimmune.....   | 23        |
| 7. Diagnostic.....  | 24        |
| 8. Traitement.....  | 26        |
| a) Nifurtimox.....  | 26        |
| b) Benznidazole.....  | 28        |
| c) Violet de gentiane.....  | 29        |
| <b>B. Aspects biologiques de résistance aux drogues.....</b>                                    | <b>31</b> |
| a) Sélection naturelle (ou artificielle).....   | 31        |
| b) Métabolisme xénobiotique.....  | 34        |
| <b>C. Glutathion.....</b>   | <b>36</b> |
| 1. Généralités.....   | 36        |
| 2. Trypanothion.....  | 37        |



|   |            |
|---|------------|
| <b>D. Produits naturels.....</b>  | <b>4 0</b> |
| 1. Les serpents .....   | 42         |
| 2. Le venin de serpent: généralités.....  | 43         |
| 3. Composition biochimique des venins.....  | 44         |
| a) <i>Toxines</i> .....   | 44         |
| b) <i>Enzymes</i> .....   | 45         |
| 4. Variabilité dans la composition des venins de serpents.....  | 45         |
| <br>  |            |
| <b>II. Résultats.....</b>   | <b>4 7</b> |
| <br>  |            |
| <b>A. Substances naturelles.....</b>  | <b>4 7</b> |
| 1. Article 1 .....  | 47         |
| 2. Purification des substances actives contre <i>Trypanosoma cruzi</i><br>présentes dans le venin de <i>Cerastes cerastes</i> ..... | 58         |
| a) <i>Matériels et Méthodes</i> .....   | 58         |
| (1) Venins .....  | 58         |
| (2) Parasites.....  | 58         |
| (a) <i>Souches</i> .....  | 58         |
| (b) <i>Culture de parasites</i> .....   | 59         |
| (c) <i>Test d'activité trypanocide</i> .....  | 59         |
| (3) Séparation des protéines.....   | 59         |
| (a) <i>Chromatographie liquide à basse pression (Sephadex G-75)</i> .....   | 59         |
| (b) <i>Chromatographie liquide à moyenne pression</i> .....   | 60         |
| (i) Colonne Mono S.....   | 60         |
| (ii) Colonne Mono Q.....  | 60         |
| (c) <i>Dosage des protéines</i> .....   | 60         |
| b) <i>Résultats</i> .....   | 61         |
| <br>  |            |
| <b>B. Substances chimiques.....</b>   | <b>6 6</b> |
| 1. Article 2 .....  | 66         |
| <br>  |            |
| <b>III. Discussion.....</b>   | <b>7 7</b> |
| <br>  |            |
| <b>IV. Conclusion.....</b>  | <b>8 3</b> |
| <br>  |            |
| <b>V. Annexes.....</b>  | <b>8 4</b> |
| <br>  |            |
| <b>A. Toxines du venin des serpents.....</b>  | <b>8 4</b> |
| (1) Neurotoxines post-synaptiques .....   | 84         |
| (2) Neurotoxines pré-synaptiques .....  | 85         |
| (3) Fasciculines.....   | 85         |
| (4) Myotoxines.....   | 85         |
| (5) Cardiotoxines.....  | 86         |
| (6) Cytotoxines.....  | 86         |
| (7) Toxines dont les activités sont mal définies .....  | 86         |



|  |            |
|--|------------|
| <b>B. Enzymes du venin des serpents.....</b>                     | <b>8 7</b> |
| (1) Phospholipases (PLA2).....                                   | 87         |
| (2) Protéases.....   | 88         |
| (a) Les endopeptidases.....                                      | 88         |
| (b) Les exopeptidases.....                                       | 88         |
| (c) Les arginine-ester-hydrolases.....                           | 89         |
| (d) Les kinogénases.....   | 89         |
| (3) Hyaluronidases.....  | 89         |
| (4) Acétylcholinestérases.....                                   | 89         |
| (5) Acides-amino-oxydases.....                                   | 89         |
| (6) Phosphoestérases.....  | 90         |
| (7) Inhibiteurs d'enzymes.....                                   | 90         |
| (8) Facteurs agissant sur la coagulation sanguine.....           | 90         |
| (9) Facteurs agissant sur les plaquettes sanguines.....          | 91         |
| (a) Composants enzymatiques.....                                 | 91         |
| (i) Phospholipase A2.....  | 91         |
| (ii) 5'- Nucléotidases.....                                      | 91         |
| (iii) Protéinases.....   | 91         |
| (b) Composants non enzymatiques agissant sur les plaquettes..... | 92         |
| (i) Inhibiteurs de l'agrégation.....                             | 92         |
| (ii) Facteurs activant des plaquettes.....                       | 92         |
| (iii) Facteurs agissant sur la paroi vasculaire.....             | 92         |
| (iv) Facteurs agissant sur les cellules endothéliales.....       | 93         |
| (v) Facteurs agissant sur l'activation de la prothrombine.....   | 93         |
| (vi) Facteurs agissant sur le fibrinogène.....                   | 94         |
| (vii) Facteurs agissant sur la protéine C.....                   | 94         |

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| <b>VI. Bibliographie.....</b> | <b>9 5</b> |
|-------------------------------|------------|

# INTRODUCTION



# I. Introduction

## A. Maladie de Chagas

La maladie de Chagas, ou la trypanosomiase américaine, est une parasitose causée par le protozoaire flagellé: *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. Cette maladie est une affection endémique qui sévit en Amérique du Sud et en Amérique Centrale. La population exposée à ce parasite est de 100 millions d'individus répartis dans 21 pays, le nombre de personnes parasitées étant estimé à environ 17 millions (WHO, 1995). Le taux de mortalité chez les enfants atteint 50%, tandis que 20% à 30% des adultes contaminés développeront des formes cliniques chroniques de la maladie, dont la plus grave est la cardiopathie chagasique.

Deux à trois semaines après l'infection, des symptômes aigus peuvent apparaître chez quelques patients. Ces manifestations sont peu sévères, sauf chez les enfants et les patients ayant un syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), où l'on peut assister parfois au développement d'une myocardite ou une méningoencéphalite. La phase clinique grave correspondant au syndrome de Chagas, apparaît 10 à 30 ans après l'infection initiale.



## 1. Agent pathogène

### a) Aspects historiques

En 1909, au cours d'une épidémie de paludisme dans le nord de l'état de Minas Gerais (Brésil), le médecin Carlos Chagas, observa dans les déjections de punaises hématophages (*Panstrongylus megistus*), des organismes différents du *Plasmodium* sp.. Suite à ces observations, Chagas mit en évidence des micro-organismes flagellés, jusqu'alors inconnus, dans le tube digestif d'un insecte réduvidé. Il leur donna le nom de *Schizotrypanum cruzi*, puis *Trypanosoma cruzi* en hommage à Oswaldo Cruz (Marsden, 1996).

Chagas se chargea de faire gorger des insectes réduvidés sur des singes sains, genre *Chalithrix* (ouistitis) à l'Institut Manguinhos à Rio de Janeiro (futur Institut Oswaldo Cruz). Aux premiers signes d'infection présentés par l'un des singes, Chagas examina le sang et y découvrit le même trypanosome. Plus tard, *T.cruzi* fut à nouveau identifié dans le sang d'un enfant (souche Bérenice) de 9 mois en phase aiguë de la maladie. En 1911, Chagas relata ses observations à l'Académie Nationale de Médecine de Rio de Janeiro en décrivant de façon précise les phases aiguës et chroniques de cette maladie ainsi que ses différentes formes cliniques. Ainsi, à lui seul, ce médecin décrivit l'hôte vecteur, le parasite, le réservoir et les formes cliniques de la maladie qui porte son nom.



## ***b) Taxonomie***

Les trypanosomes présentent la position taxonomique suivante (Levine et al., 1980):

**Règne:** Protista

**Sous-règne:** Protozoa

**Phylum:** Sarcomastigophora      **Honigberg & Balamuth, 1963**

**Sous-phylum:** Mastigophora      **Diesing, 1866**

**Classe:** Zoomastigophora      **Calkins, 1909**

**Ordre:** Kinetoplastida      **Honigberg, 1963**

*emend* **Vickerman, 1976**

**Sous-ordre:** Trypanosomatina      **Kent, 1880**

**Famille:** Trypanosomatidae      **Doflein, 1901**

**Genre:** *Trypanosoma*      **Gruby, 1843**

Pendant la majeure partie de leur cycle biologique, les membres de la famille des Trypanosomatidae présentent une cellule légèrement aplatie et allongée. Ces organismes sont alors munis d'un flagelle pour se déplacer. A la proximité de la base du flagelle, dénommé corpuscule basal ou kinétosoma ou cinétosome, se trouve le kinétoplaste. Ce dernier est un corps filamenteux contenant un réseau fibreux d'ADN (k-ADN). Le kinétoplaste se trouve dans un simple mitochondrion.

La famille des Trypanosomatidae est constituée par les genres suivants (Mc Ghee et Cosgrove, 1980; Molineux et Ashford, 1983):

♦ *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* et *Rhynchoidomona* dont le cycle est monoxénique et sont des parasites d'insectes.



♦ *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum* et *Phytomonas* ont un cycle hétéroxénique, c'est-à-dire, un hôte vertébré et un hôte hématophage vecteur. Les *Phytomonas* sont des parasites des plantes, tandis que les autres genres sont parasites de vertébrés.

Le genre *Trypanosoma* parasite une grande variété de vertébrés, qui s'étend des poissons aux mammifères. La plupart des espèces qui appartiennent à ce genre possèdent une alternance d'hôtes.

Suivant le lieu où se produit le phénomène de métacyclogénèse, qui aboutit au stade infectant ou métacyclique, et suivant le mode de transmission, les trypanosomes de mammifères sont classés en deux sections, **Salivaria** et **Stercoraria** (Hoare, 1972).

La section *Salivaria* regroupe les espèces de trypanosomes qui se transmettent de façon mécanique, par inoculation, et les espèces où le processus de métacyclogénèse se développe dans la partie antérieure de l'intestin de l'insecte vecteur. La transmission se fait par inoculation de la salive du vecteur à l'hôte mammifère. Les sous-genres qui appartiennent à ce groupe sont *Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon* et *Pycnomonas*.

Dans la section *Stercoraria*, on trouve les espèces de trypanosomes qui développent la forme infestante dans la partie terminale de l'appareil digestif du vecteur et qui contaminent l'hôte mammifère par leurs déjections. Ce groupe d'organismes rassemble les sous-genres *Megatrypanum*, *Herpetosoma* et *Schizotrypanum*.

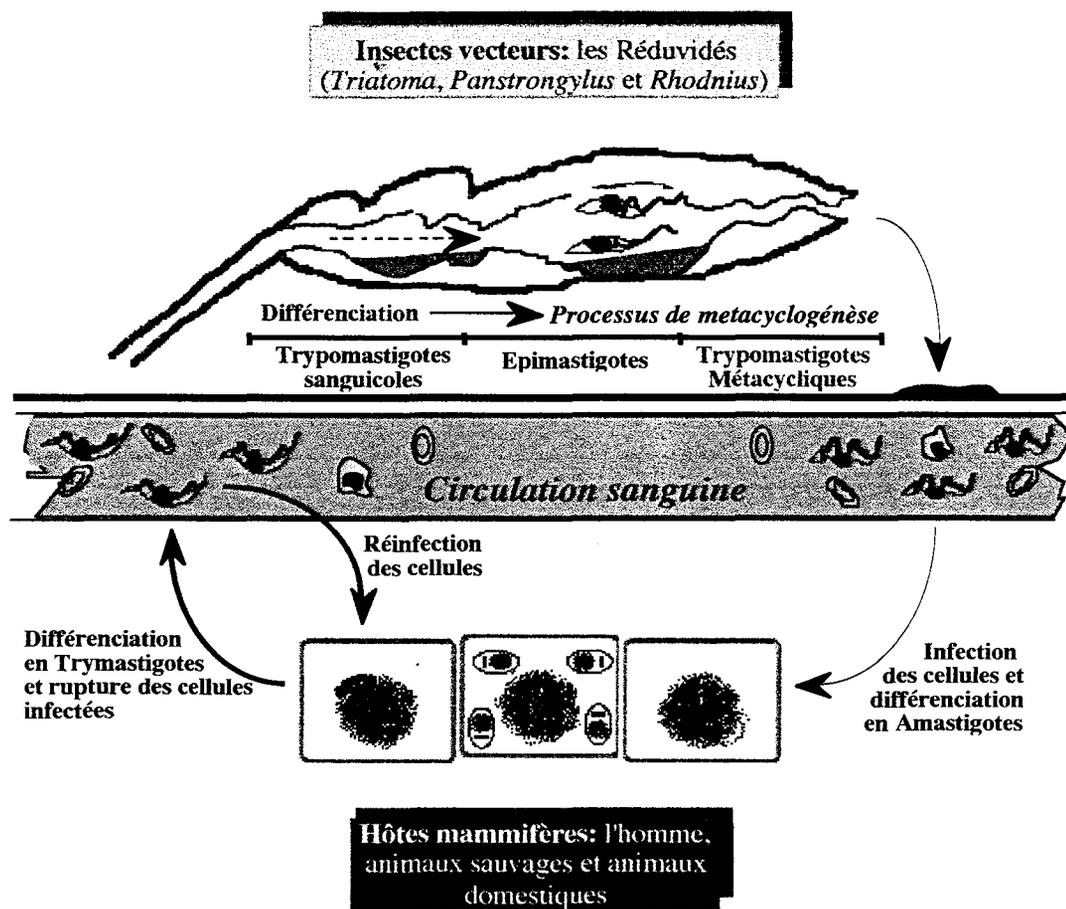
Le protozoaire qui entraîne la maladie de Chagas est donc classé taxonomiquement comme: *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.



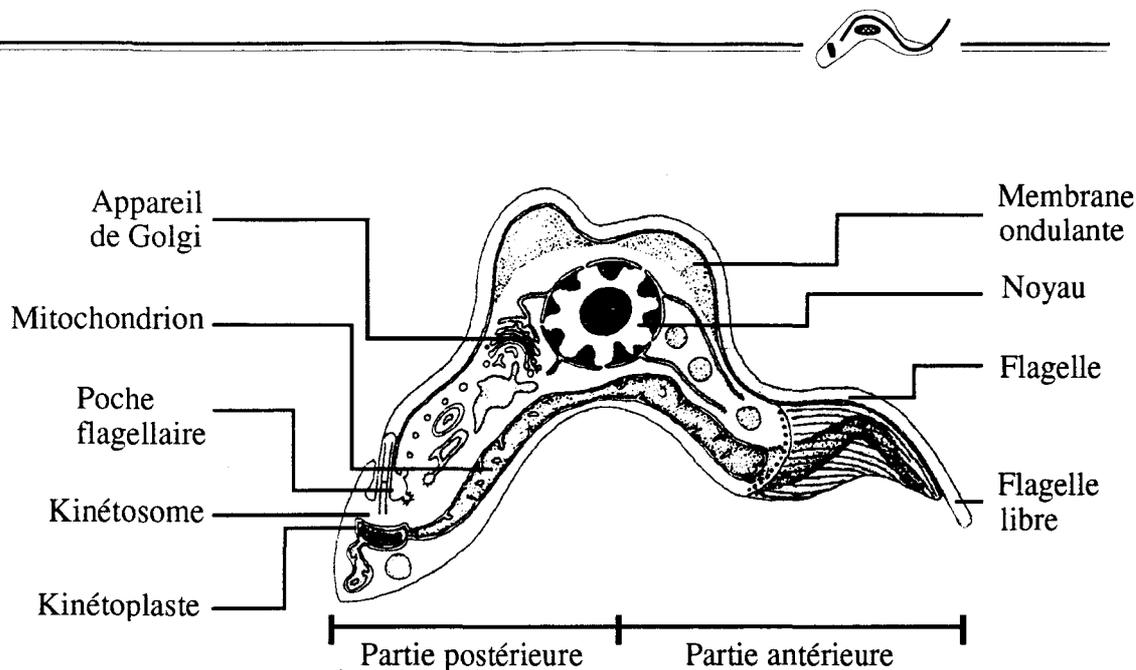
### ***c) Cycle biologique***

Le parasite est normalement transmis à l'homme ou à d'autres espèces de mammifères par un insecte vecteur, un hémiptère hématophage de la famille des Réduviidés.

Le cycle de *T.cruzi* a lieu comme suit: lorsque le réduvide effectue son repas sanguin sur un vertébré infecté, les trypomastigotes sanguicoles atteignent le tube digestif moyen de l'insecte où ils se transforment en épimastigotes qui se multiplient par division binaire. Dans le tube digestif postérieur, ils se différencient en trypomastigotes métacycliques, forme infestante pour l'homme et les autres mammifères. A ce stade, les parasites sont déposés passivement avec les déjections de l'insecte lors d'un repas sanguin et pénètrent chez l'hôte vertébré au niveau du point de piqûre ou à la faveur d'une autre excoriation, cutanée ou muqueuse. Une fois dans le sang, les parasites peuvent infecter divers types cellulaires. A l'intérieur de la cellule, les trypomastigotes s'établissent dans le cytoplasme où ils se différencient en forme amastigote puis se multiplient par scissiparité. Après un certain nombre de cycles de division, les amastigotes se différencient en trypomastigotes qui sont libérés dans le sang après rupture de la cellule infectée. Ces formes libérées, dénommées trypomastigotes sanguicoles pourront être de nouveau prélevées par l'insecte lors d'un repas sanguin ou aller infecter d'autres cellules de l'hôte (Figure suivante).



Le cycle biologique de *T. cruzi* est long, complexe et comporte plusieurs stades, tant chez la réduve que chez l'hôte définitif. Ce phénomène, nommé polymorphisme, implique le repositionnement du complexe kinéto-some-kinétoplaste par rapport au noyau et à la partie antérieure du corps du parasite (Figure suivante) (Vickerman, 1976).



Représentation schématique des principales structures d'un trypanosome sanguicole, *T. brucei* (D'après Vickerman et al., 1992).

#### *d) Stades parasites*

Chez l'insecte vecteur, on trouve les stades suivants: épimastigotes et trypanosomes métacycliques et chez les mammifères, les formes amastigotes et trypanosomes.

La forme trypanosome sanguicole mesure de 15-20  $\mu\text{m}$  de long. Elle possède un noyau central et un grand kinétoplaste. Le trypanosome est mobile grâce à une membrane ondulante unie à un flagelle émergeant de la partie postérieure qui se prolonge autour du corps jusqu'à la partie antérieure où il devient libre. La forme amastigote est ovale, mesure de 3-6  $\mu\text{m}$  de diamètre. Elle a un flagelle récurrent. La forme épimastigote mesure environ 20  $\mu\text{m}$  de longueur, et possède un noyau proéminent et central. Le kinétoplaste est antérieur au noyau, et le flagelle a son origine dans la partie antérieure finale du parasite (Nogueira et Coura, 1984).

Le stade trypanosome sanguicole présente aussi un dimorphisme particulier dans le flux sanguin, puisque l'on distingue les formes  **fines**  et les formes  **trapues**  (Brener, 1973).



Les formes fines ont un noyau allongé, le kinétoplaste est subterminal, le flagelle est long et libre. Ce type de trypanomastigote devient rapidement intracellulaire. Chez le vecteur, leur morphologie et leur mouvement se maintiennent durant 4-5 jours puis le parasite dégénère.

Les formes trapues présentent un noyau en position postérieure; le kinétoplaste est terminal et le cytoplasme est fortement vacuolisé. Ces formes circulent dans le sang pendant quelques jours et seraient résistantes à la réponse immune de l'hôte. Chez l'hôte intermédiaire, elles se transforment soit en épimastigotes, soit en formes rondes qui s'apparentent à la forme amastigote, sphaeromastigote.

### *e) Souches*

Dans une population de parasites, différentes souches peuvent émerger en réponse à des pressions sélectives produites par l'environnement (Bryant et Behm, 1989; Nozaki et Dvorak, 1993). Ces réponses adaptatives peuvent se traduire par des variations biologiques particulières à chaque souche, sans altérer les caractéristiques générales de l'espèce.

*T. cruzi* constitue un bon exemple de ce phénomène. En effet, la dispersion géographique du parasite a permis d'observer des modifications intraespèces importantes. Ces modifications peuvent être caractérisées par des méthodes aussi bien biologiques, qu'immunologiques ou biochimiques (Bryant et Behm, 1989; OMS, 1991).

La caractérisation biologique des souches est basée sur l'évolution de l'infection chez les animaux de laboratoire (virulence, tropisme tissulaire, etc.) et sur la résistance aux médicaments utilisés contre la



maladie de Chagas (Andrade et Figueira, 1977; Kierszenbaum, 1984). La caractérisation immunologique est fondée sur des méthodes classiques (western blot, immunofluorescence, etc.). Les anticorps monoclonaux permettent de mettre en évidence des différences antigéniques dans une population de parasites (Andrews et al., 1987).

La caractérisation biochimique permet d'identifier des variants de *T.cruzi* au niveau moléculaire. Actuellement, les techniques d'électrophorèse (Lowndes, 1996) et d'isoélectrofocalisation, ainsi que l'analyse de l'ADN, sont les plus utilisées pour déceler ces variants.

La séparation des protéines par électrophorèse ou électrofocalisation, permet de détecter et d'identifier des variations, notamment au niveau de plusieurs enzymes. Ces techniques permettent de mettre en évidence des enzymes ayant une activité analogue mais un point isoélectrique différent: les *isoenzymes*. Les groupes de souches qui présentent un même profil enzymatique, sont appelés zymodèmes.

L'analyse enzymatique de *T.cruzi* a permis de montrer l'existence de trois groupes de zymodèmes (Z1, Z2, Z3), qui correspondent à des cycles distincts. Les zymodèmes Z1 développent un cycle sylvatique, la population Z2 un cycle domestique et le Z3 un cycle particulier que l'on trouve chez le tatou. Dans certains cas d'infection chagastique aiguë, les zymodèmes Z1 et Z3 ont été détectés, alors que le zymodème Z2 a été identifié dans le cas de patients chagastiques chroniques (Bryant et Behm, 1989).



## 2. Vecteurs

Sur 117 espèces de réduves décrites dans le monde, 105 sont rencontrées sur le continent américain. De Salt Lake City (Etats-Unis d'Amérique) au 41° de latitude Nord, où l'on a recensé l'espèce *Triatoma protacta*, jusqu'en Patagonie (Argentine) au 46° de latitude Sud, où on trouve *T. patagonica* (OMS, 1991)

Ces sortes de punaises sont classifiées taxonomiquement dans l'ordre des Hémiptères, famille des Réduviidés et sous-famille des Triatomes. Au sein de cette sous-famille, sont définis plusieurs genres, dont 12 sont impliqués dans le cycle de transmission de *T. cruzi*, soit au niveau domestique, péri-domestique ou sylvatique. Parmi ces 12 espèces, 7 sont importantes au niveau de l'aspect épidémiologique en Amérique du Sud et Central: *Rhodnius prolixus*, *R. pallescens*, *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida* et *Panstrongylus megistus*.

La nymphe et le stade adulte des réduves sont des hématophages obligatoires. Ceci implique que l'insecte soit constamment au contact des vertébrés, colonisant ses écotopes naturels.

La parasitose provoquée par *T. cruzi* est établie chez une grande variété de mammifères sauvages. L'homme a envahi et bouleversé l'environnement naturel du vecteur de *T. cruzi* provoquant de nouvelles situations épidémiologiques, par exemple, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* et *T. dimidiata*, insecte d'origine sylvestre, sont des espèces qui ont évolué de façon à s'adapter à l'habitat humain. Ces conditions impliquent l'interaction entre l'homme, le vecteur, et le mammifère sauvage et/ou domestique. Ces processus sont nommés *anthropozoonoses* (infections que l'homme a



acquis par les animaux). Les réduves sont trouvées dans divers endroits, comme les milieux domestiques et péri-domestiques, et spécialement à l'intérieur des habitations. Les repas sanguins sont donc prélevés sur les hôtes habituels du lieu: homme, chien, chat, poulet, etc.

De ce fait, le terme *amphixenosis* est aussi employé dans cette parasitose, car l'infection peut être transmise de part et d'autre: de l'homme à l'animal ou de l'animal à l'homme (Nelson, 1988).

### 3. Réservoirs

Comme nous l'avons vu précédemment, la Trypanosomiase américaine peut être considérée comme une vraie zoonose, où le cycle évolutif du parasite s'établit dans une grande variété d'animaux sauvages, domestiques et péri-domestiques. L'homme est un hôte relativement récent. Il existe des évidences de transmission interhumaine, ainsi que des variations génétiques de *T.cruzi* au niveau de la distribution géographique de l'épidémiologie de la maladie de Chagas (Nelson, 1988).

Les réservoirs animaux de la Trypanosomiase américaine ont une vaste aire d'expansion identique à celle des réduves, située du sud des Etats-Unis jusqu'au sud de l'Argentine (OMS, 1991). Environ 150 espèces d'animaux ont été identifiées comme des réservoirs pour *T.cruzi*. Elles sont réparties en 5 ordres: Marsupiaux, Edentés, Chiroptères, Carnivores, Lagomorphes et Primates.

D'un point de vue écologique, le réservoir joue un rôle important dans le maintien de l'espèce parasitaire.

L'espèce de réservoir, sa niche écologique, sa densité de population et sa distribution géographique, ainsi que le contact avec le biotope du



vecteur, font partie, entre autres, des notions fondamentales du réservoir.

L'homme, le chien et le chat sont les réservoirs les plus importants dans le cycle de transmission domestique. Les principaux réservoirs du cycle péri-domestique sont l'opossum, le rat, la souris et le cobaye. Tandis qu'au niveau de la transmission sylvatique, le tatou et l'opossum sont les hôtes privilégiés.

L'opossum, en particulier le genre *Didelphis*, constitue un réservoir important de *T. cruzi* dans différents pays du continent américain. Le pourcentage d'individus infectés varie de 20% à 100% selon les régions. Le mouvement entre les écotopes domestiques et sylvatiques favorise la dispersion géographique. De plus, un cycle particulier de développement de *T. cruzi*, au niveau de la glande anale, a pu être observé chez certaines espèces. Ce cycle, parallèle au cycle intracellulaire classique, présente une répllication et une différenciation identiques à celles observées dans l'intestin de l'insecte vecteur, c'est-à-dire, une transformation des épimastigotes en trypomastigotes métacycliques. Dans ce cas particulier, les opossums peuvent éliminer des formes infestantes dans leurs sécrétions glandulaires ou dans leurs excréments. Ce mode spécial de transmission a des implications épidémiologiques évidentes (Deane et al., 1986; Travi et al., 1994).



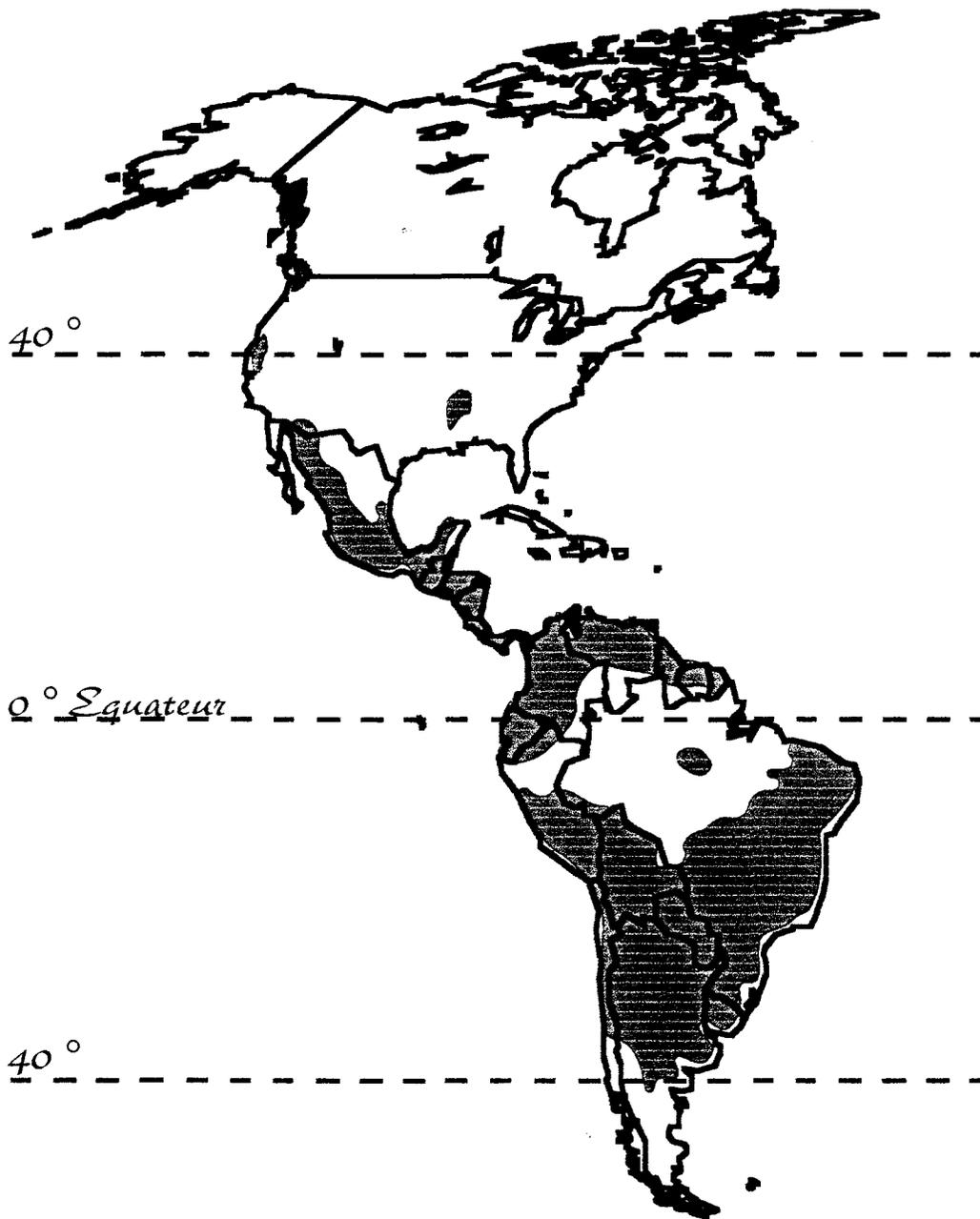
## 4. Epidémiologie

### *a) Distribution géographique*

La maladie de Chagas représente un éminent problème de santé publique sur près du quart de la population d'Amérique Latine. 100 millions de personnes réparties dans 21 pays sont exposées à cette maladie. Le nombre annuel de décès est estimé à 45000 avec une incidence de 4 millions (Tableau suivant) (WHO, 1995).

| <b>Maladies Infectieuses</b> | <b>Décès (10<sup>3</sup>)</b> | <b>Prévalence (10<sup>5</sup>)</b> | <b>Incidence (10<sup>5</sup>)</b> |
|------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Paludisme                    | 2000                          | 4000                               | ...                               |
| Schistosomiase               | 200                           | 2000                               | ...                               |
| Leishmaniose                 | 197                           | 127                                | 72                                |
| Amibiase                     | 70                            | 480                                | ...                               |
| Trypanosomiase africaine     | 55                            | 2,7                                | 0,6                               |
| Trypanosomiase américaine    | 45                            | 170                                | 4                                 |
| Total                        | 2567                          | 6779,7                             | 76,6                              |

L'infection humaine est constatée dans une zone qui s'étend du sud des Etats-Unis (42° de latitude nord), jusqu'au sud de l'Argentine et du Chili (46° de latitude sud). Il existe une concordance relative entre les zones d'endémie, la distribution géographique de l'insecte vecteur et du réservoir animal (Figure suivante).



Les manifestations pathologiques et les caractéristiques épidémiologiques de la maladie de Chagas sont variables d'une région endémique à une autre. La cardiopathie chagasiqne se rencontre plus fréquemment au Venezuela, en Colombie et dans d'autres pays d'Amérique Centrale, tandis que le viscéropathie est observée au Brésil, en Uruguay, en Argentine, au Paraguay, au Chili et au Pérou. D'autre part, la coexistence de ces deux syndrômes a pu être observée



en Equateur et en Bolivie (De Rezende, 1975; Cueva et Romero, 1987). Bien que le vecteur et le réservoir animal soient continuellement présents, seuls quelques cas sporadiques d'infection humaine se sont déclarés aux Etats-Unis (Navin et al., 1985; Hagar et Rahimtoola, 1991; Pung et al., 1995; Ochs et al., 1996).

### ***b) Modes de transmission***

La transmission de *T. cruzi* à l'homme survient de manière naturelle, au niveau de la peau ou des muqueuses de l'hôte suite au contact avec les formes infectantes du parasite présentes dans les déjections des réduves.

D'autres modes de transmission ont été décrits (OMS, 1991; Marsden, 1996). En effet, le risque d'infection à l'occasion d'une transfusion sanguine ou d'une greffe d'organe pose de sérieux problèmes dans les pays endémiques et hors de ceux-ci.

De plus, la transmission aux enfants par voie congénitale et, dans certains cas par allaitement maternel, a été observée tandis que les mères présentaient des symptômes de phase aiguë ou chronique de la maladie.

Il existe également chez l'homme, des cas de contamination par consommation d'aliments. Ce mode de transmission a pu être confirmé sur des animaux de laboratoire.

La probabilité d'infection au laboratoire est très faible et ne peut être qu'accidentelle. Ces accidents peuvent être provoqués lors d'un contact avec des produits contaminés ou lors d'une mauvaise manipulation de cultures ou de suspensions de *T. cruzi*.

## **5. Aspects cliniques**

Dans la maladie de Chagas, on distingue trois phases: une phase



aiguë de courte durée, une phase indéterminée ou phase de latence clinique et une phase chronique prolongée où se manifestent des états pathologiques caractéristiques (Prata, 1975; de Rezende, 1975; OMS, 1991; Marsden, 1996).

### **a) Phase aiguë**

Cette phase se développe suite à l'infection et passe souvent inaperçue, on estime à 2% le nombre de cas diagnostiqués. Dans la majorité des cas, les symptômes régressent trois à quatre semaines après le début de cette phase.

Le chagoma est le point de pénétration du parasite déposé par le réduvidé sur l'hôte. Dans 90% des cas, la phase aiguë débute par un chagome oculaire ou *signe de Romana*. A cet endroit, il y a formation d'un complexe ophtalmo-ganglionnaire comportant un oedème bipalpébral unilatéral, rosé violacé, indolore et une conjonctivite. Lorsque le chagoma est situé sur d'autres parties du corps, il provoque une manifestation cutanée, qui peut évoquer un érysipèle, à laquelle peut succéder une tumeur cutanée, des furoncles ou des nodules sous-cutanés. La période d'invasion peut durer environ un mois avec une multiplication intense du parasite qui se dissémine dans différents organes. Dans la plupart des cas et quelque soit la porte d'entrée, conjonctive ou sous-cutanée, on assiste à la formation d'un oedème et d'une infiltration leucocytaire avec prédominance de macrophages et de lymphocytes. Une invasion ultérieure des tissus par des fibroblastes, des cellules géantes et des lymphocytes peut être observée.

Les manifestations cliniques pendant la phase aiguë peuvent être les suivantes: un état fébrile (38-40°C) rémittent pendant plusieurs



semaines et des céphalées. Une myocardite aiguë est constatée par des anomalies de l'électrocardiogramme (ECG) chez 30% environ des malades. Ces anomalies cardiaques se traduisent généralement par une tachycardie sinusale, une altération de la repolarisation ventriculaire et un blocage en premier degré de la région atrioventriculaire.

On observe également une lymphadénopathie, une anasarque, une hépatosplénomégalie et une tuméfaction des ganglions lymphatiques. Une anorexie, des diarrhées et des vomissements peuvent compléter le tableau clinique. A ce stade, la mortalité atteint 2 à 3% des sujets, particulièrement chez les enfants de moins de 2 ans.

Une complication grave de méningo-encéphalite peut survenir surtout chez les enfants de moins de 2 ans, associée à des convulsions fébriles ou afebriles, une raideur de la nuque et des pertes de conscience. La mortalité peut alors atteindre 50% des cas.

L'association du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) avec la maladie de Chagas, est actuellement très rencontrée dans les régions endémiques de cette parasitose. Des individus atteints du SIDA et présentant une phase chronique ou étant récemment infestés par *T. cruzi* peuvent développer une phase aiguë de la maladie de Chagas. Les manifestations pathologiques observées dans la plupart des cas montrent une méningo-encéphalite multifocale ou diffuse, tandis que d'autres présentent une myocardite aiguë (Castillo, 1990; Simao, 1991; Oddo et al., 1992; Gluckstein et al., 1992; Rocha et al., 1994).



## ***b) Phase indéterminée***

Cette phase se manifeste dans un intervalle de 9 à 10 semaines après l'état aiguë de la maladie et peut durer de 10 à 30 ans. L'individu infesté semble être en bonne condition physique, malgré un diagnostic positif, il est donc asymptomatique. L'ECG ne montre aucune modification et aucune anomalie n'est observée à l'examen radiologique du thorax. Par contre, une fibrose du myocarde due à l'inflammation du tissu cardiaque peut être observée (Prata, 1975). Le seul examen parasitologique qui révèle des trypomastigotes circulants dans le sang est le xénodiagnostique (20 à 60% des cas).

## ***c) Phase chronique***

Les symptômes de cette phase surviennent des années après l'état aiguë. Ces manifestations cliniques sont dues à une atteinte du tissu cardiaque, du tube digestif et du système nerveux, qui peuvent apparaître séparément ou associées chez un même individu.

### **(1) Cardiomyopathie chagastique**

Les manifestations cliniques caractéristiques de cette phase sont des palpitations, des syncopes, des douleurs thoraciques et des étourdissements. La radiographie du thorax permet d'apprécier l'hypertrophie cardiaque. L'aggravation résulte en une embolie pulmonaire et générale.

Un anévrisme cardiaque du ventricule gauche s'observe dans plus de 50% des cas et il constitue le signe principal de la cardiopathie chagastique chronique, aboutissant à la mort subite.

L'ECG montre des modifications du système de conduction auriculo-ventriculaire. Des variations dans le rythme nodal, le blocage atrio-ventriculaire en premier degré et la diminution du voltage QRS



résultent d'altérations du noeud sinusal et du tissu conducteur. Ce tissu est remplacé progressivement par du tissu adipeux, moins bon conducteur que les tissus organiques. Des lésions vasculaires suivies par un épaissement de l'intima, une hypertrophie des fibres musculaires artérielles et une thrombose vasculaire sont également révélés. Une myocardite diffuse avec infiltration de lymphocytes, de macrophages, de plasmocytes et d'éosinophiles, est présente à l'examen histologique. Les fibres myocardiaques peuvent subir une cytolysse et sont remplacées par une fibrose focale et interstitielle.

## **(2) Viscèropathie chagasiq**

La dilatation des viscères pendant l'infection par *T. cruzi* pourrait être produite par la destruction des cellules nerveuses du système neurovégétatif périphérique du tube digestif. Des examens histologiques montrent que les cellules de ce type sont peu abondantes ou absentes du ganglion mésentérique. De plus, on constate la présence d'infiltrations focales de cellules mononuclées au niveau de la tunique musculaire et du plexus mésentérique.

La pathogénie de la phase chronique au niveau viscéral dépend du degré de dénervation de certains organes qui peut s'élever à 90% pour l'oesophage. On observe dans ce cas un méga-oesophage, tandis que pour le côlon environ 55% de dénervation sont suffisants pour provoquer un méga-côlon.

## **(3) Neuropathie chagasiq**

Les manifestations neurologiques pendant la phase chronique, moins évidentes que les manifestations cardiaques et viscérales, ont de fait été beaucoup moins étudiées.

Néanmoins, des études histologiques menées sur des animaux de



laboratoire, au cours d'une infection aiguë, révèlent de faibles lésions du système nerveux périphérique; tandis qu'au cours d'une infection chronique, on observe une dégénérescence de la myéline, des lésions des fibres nerveuses, ainsi que des infiltrations périvasculaires (Said et al., 1985; Gea et al., 1993).

Pendant la phase chronique de la maladie de Chagas, des altérations du système neurovégétatif et de certaines fonctions physiologiques sont observées. Ceci peut être corrélé à des expériences fondamentales sur le système nerveux autonome.

Au niveau histologique, on observe également une diminution des cellules de Purkinje au niveau cérébelleux (Hoff et al., 1978).

D'autre part, des stades trypomastigotes et des anticorps dirigés contre le parasite, ont été trouvés dans le liquide céphalo-rachidien d'individus infectés, au cours de la phase aiguë et chronique de la maladie (Hoff et al., 1978; Spina-França et al., 1988). Cette observation peut être importante dans la détermination de la relation qui existe entre les manifestations pathologiques du système nerveux et la réponse immune.

## **6. Aspects immunologiques de l'infection chagasique**

Après l'infestation, *T.cruzi* persistera pendant toute la durée de vie de son hôte. L'homme ou l'animal, (au cours de la phase aiguë de l'infection) présente une densité élevée de trypomastigotes dans le sang. Le nombre de parasites diminue progressivement jusqu'à leur disparition de la circulation sanguine pendant la phase chronique. L'infection est contrôlée lorsque le système immunitaire humoral commence à répondre de façon efficace. Néanmoins, tous les



parasites ne sont pas éliminés, car ils ont envahi différents types cellulaires où ils sont inaccessibles aux anticorps et pourront se multiplier (Hontebeyrie-Joskowicz, 1993).

La production des anticorps est stimulée par la présence d'antigènes circulants dans la sang. L'origine de ces antigènes peut provenir de molécules sécrétées-excrétées par le parasite ou de la destruction des cellules parasitées qui entraîne la libération de toxines parasitaires ou d'enzymes cellulaires (Brener, 1980; Ouaiissi, 1993). La stimulation antigénique est alors induite suite à la dégradation et à la présentation des antigènes parasitaires par des cellules effectrices.

Toute infection chronique est ainsi caractérisée par la présence d'antigènes circulants, la persistance d'une stimulation antigénique et la formation de complexes immuns (Roitt, 1994).

### ***a) Manifestations immuno-pathologiques et activation polyclonale des lymphocytes T et B***

#### **(1) Lymphocytes T**

Pendant la phase aiguë de l'infection chagasique, les lymphocytes B et une grande partie des lymphocytes T sont activés. Des expériences réalisées chez la souris montrent que la présence de lymphocytes T CD8+, au cours de cette phase, joue un rôle important dans le contrôle de la parasitémie. Des antigènes parasitaires présents à la surface des cellules infectées par *T.cruzi* sont la cible des cellules CD8+ et d'autres types cellulaires intervenants dans les mécanismes cytotoxiques. Ce processus conduit à des manifestations pathologiques, conséquence directe ou indirecte du parasitisme



(Velge et al., 1991; Hontebeyrie-Joskowicz, 1993).

Des souris déplétées en lymphocytes T CD4+ présentent une absence d'activation polyclonale des cellules B, ainsi qu'une absence de la réponse des cellules T CD8+. Par ailleurs, le transfert à des souris saines de lymphocytes T CD4+ de souris ayant une infection chronique, montre que ces cellules CD4+ sont responsables de l'état pathologique en absence des parasites (Said et al., 1985; Hontebeyrie-Joskowicz, 1993; Ouaisi, 1993).

## (2) Lymphocytes B

L'activation polyclonale des lymphocytes B, dans un modèle expérimental de souris infectées par *T. cruzi*, provoque une hypergammaglobulinémie. Ces immunoglobulines n'ont pas de spécificité anti-*T. cruzi* et les isotypes majeurs sont des IgG2a et IgG2b. Une activation polyclonale non spécifique et non contrôlée implique que la régulation de la réponse immune est perturbée. Ceci conduit à la rupture de la tolérance aux antigènes du soi, et par conséquent à la production d'un taux élevé d'autoanticorps (Minoprio et al., 1988; Hontebeyrie-Joskowicz, 1993).

Des expériences *in vitro* et *in vivo*, suggèrent qu'une substance de type LPS provenant du parasite peut être impliquée dans le processus d'activation polyclonale des lymphocytes B. Des résultats similaires sont obtenus avec un peptide dérivé d'une glycoprotéine de surface de 85 kDa provenant du stade trypomastigote (Goldberg et al., 1983; Pestel et al., 1992).

L'infection par *T. cruzi* des souris Balb/Xid (souche déficiente en lymphocytes B1 CD5+) se différencie de celles des souris Balb/c (souche normale) par une absence d'activation polyclonale des



cellules B, une réduction du taux d'immunoglobulines circulantes, une parasitémie faible et une absence de pathologie cardiaque et musculaire 40 jours après l'infection (Minoprio et al., 1991). Les cellules CD5+ sont impliquées, entre autre, dans la production d'autoanticorps et interviennent donc dans le phénomène d'autoimmunité.

### ***b) Pathologie autoimmune***

La pathologie autoimmune occasionnée lors de l'infection par *T. cruzi* pourrait être liée à deux phénomènes (Eisen et Kahn, 1991):

- ◆ Une activation polyclonale dépendante des lymphocytes T CD4+ responsable de la prolifération de clones autoréactifs au cours de la phase aiguë et chronique de l'infection.
- ◆ Une réaction croisée dûe à la présence de molécules parasitaires qui présentent des séquences peptidiques similaires à celles des molécules de l'hôte. En effet, des molécules parasitaires peuvent être à l'origine de réponses immunes dirigées contre l'hôte, entraînant ainsi le développement d'autoimmunité qui est souvent associé aux maladies parasitaires (Capron et Dessaint, 1992).

Par exemple, dans le tissu cardiaque:

- a) des anticorps dirigés contre la myosine cardiaque ont été mis en évidence dans le sang de patients infectés par *T. cruzi*. Ces anticorps sont capables de reconnaître également la protéine B13 du parasite (Cunha-Neto et al., 1995),
- b) de même, une identité de séquence peptidique existe entre la protéine PO. des ribosomes de *T. cruzi* et le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique cardiovasculaire de l'homme (Ferrari et al., 1995).

Des réactions croisées ont également pu être mis en évidence au



niveau des tissus nerveux:

- a) des anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre un peptide de surface des trypomastigotes (85 kDa) de *T. cruzi* (155D3), reconnaissent l'acétylcholinestérase (AChE) humaine. Des tests immunologiques ont montré que des IgG de sérums de patients chroniques chagasiques, sont capables d'inhiber l'interaction de l'AChE avec l'AcM 155D3 (Ouaissi et al., 1988),
- b) dans le même contexte, des anticorps dirigés vis-à-vis d'une protéine de surface de 160 kDa de *T. cruzi*, associée au flagelle, sont capable de réagir avec une protéine de 48 kDa présente dans le système nerveux central, le nerf périphérique et le plexus méésentérique chez l'homme, le rat et la souris (Van Voorhis et Eisen, 1989).

De manière générale, la région antigénique qui induit la production d'anticorps et qui déclenche la réaction croisée entre l'hôte et le parasite comprend 7 à 9 acides aminés (Eisen et Kahn, 1991).

## 7. Diagnostic

Le dépistage de la maladie de Chagas ne peut pas se limiter au diagnostic clinique car les symptômes, soit de la phase aiguë, soit de la phase chronique, ne se manifestent pas chez tous les patients. La recherche des parasites, d'anticorps spécifiques et/ou d'antigènes circulants dans des fluides biologiques s'avère nécessaire au dépistage et permet d'évaluer la capacité curative des agents chimiothérapeutiques au cours du traitement des patients.

Il existe plusieurs méthodes pour mettre en évidence la présence de *T. cruzi* chez les malades. Ces méthodes doivent répondre à certaines caractéristiques: spécificité, sensibilité, fiabilité et rapidité. De plus,



elles doivent être peu coûteuses, car elles s'adressent à des populations de pays en voie de développement.

La phase aiguë peut être diagnostiquée dans 90% des cas par des examens directs comme le frottis mince, la goutte épaisse ou à l'état frais, entre lame et lamelle. La concentration du sang par centrifugation peut augmenter la probabilité de détection. Ces méthodes peuvent également être employées pour la recherche des parasites dans le liquide céphalo-rachidien (OMS, 1991; Marsden, 1996).

Les méthodes parasitologiques comme le xénodiagnostic et l'hémoculture peuvent être utilisées, soit dans la phase aiguë, soit dans la phase chronique. Ces techniques permettent d'augmenter la sensibilité le nombre de parasites.

La première réponse du système immunologique vis-à-vis de l'infection par *T. cruzi*, pendant la phase aiguë, est la production d'immunoglobulines, spécifiquement de type IgM. A mesure que la maladie progresse, d'autres types d'immunoglobulines, par exemple, de la classe IgG peuvent être détectés. Dans la phase chronique, et spécialement dans le cas de mégaviscères, des IgA peuvent apparaître. Les deux phases, aiguë et chronique, sont alors diagnostiquées par des méthodes sérologiques (Brener, 1980).

Les plus employées sont:

- ◆ l'immunofluorescence indirecte.
- ◆ la réaction de fixation ou de déviation du complément (ou réaction de Machado Guerreiro).
- ◆ l'agglutination directe.
- ◆ l'agglutination indirecte au latex.



♦ test immunoenzymatique (ELISA) (Guevara et al., 1995)

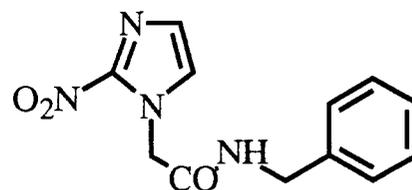
Actuellement, le développement des techniques de biologie moléculaire comme la réaction d'amplification en chaîne par la polymérase ou PCR, ont permis de détecter l'ADN du parasite dans un mélange de cellules, sang ou tissu, de patients ou d'animaux infectés. De plus, ce test spécifique peut être employé pour les études cliniques et épidémiologiques (Sturm, 1989; Wincker et al., 1994; Krautz et al., 1995; Taibi et al., 1995; Ochs et al., 1996).

## 8. Traitement

Actuellement, le traitement de la maladie de Chagas est basé sur l'utilisation de deux nitrocomposés: le **nifurtimox** (3-méthyl-4-(5'-nitrofurfurylidèneamino) tétrahydro- 4H-1,4-thiazine- 1,1-dioxyde; *Lampit*, Bay 2502) et le **benznidazole** (*N*-benzyl-2-nitro-1-imidazoleacetamide; *Rochagan*, *Radinil*, Ro 7-1051). Tandis que, le violet de gentiane est utilisé fréquemment pour éliminer les parasites éventuellement présents dans les poches de transfusion sanguine (Figure suivante).



Nifurtimox



Benznidazole

### a) *Nifurtimox*

Ce dérivé de nitrofuran est indiqué dans le traitement de la phase aiguë de la maladie. Les résultats thérapeutiques sont variables, de 30



à 86% de guérison, et dépendent pour une grande partie de la population traitée, notamment, de la moyenne d'âge du groupe étudié (Kierszenbaum, 1984). D'autres critères vont entrer en compte comme l'effet sur les manifestations cliniques ou sur la charge parasitaire et ceci en fonction de la région géographique et l'origine de la souche parasitaire.

La réduction intracellulaire du groupement nitré du Nifurtimox par des nitroréductases conduit à la formation de radicaux nitroanions ( $R-N O_2^{\circ-}$ ), suivie d'un cycle rédox où sont produits des anions superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ) et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). *T. cruzi* est particulièrement déficient en enzymes impliquées dans le mécanisme de détoxification de ces radicaux libres ce qui le rend sensible à cette drogue (Marr et Docampo, 1986; Morello, 1988).

Le nifurtimox est administré chez les adultes et les enfants de plus de 16 ans à raison de 8 à 10 mg/kg/jour en 2 prises pendant 4 mois. Pour les enfants, qui répondent moins bien que les adultes, les doses varient avec l'âge, de 15 à 20 mg/kg/jour par période de 3 mois.

Des effets indésirables sont observés chez 45 à 70% des patients chez lesquels des altérations du système nerveux central et du système digestif sont détectées. Ces effets peuvent se manifester par des nausées, perte de poids, des douleurs musculaires, une polynévrite, des sensations sensibles anormales (fourmillements, brûlures, etc) ou encore des convulsions. En plus d'un état de fatigue général, on peut également noter une inhibition de la spermatogénèse, ainsi que l'apparition de carcinomes. La production des radicaux libres est probablement à l'origine de la toxicité du Nifurtimox sur les tissus (Kierszenbaum, 1984; Docampo et Moreno, 1985; de Castro, 1993).



## ***b) Benznidazole***

Ce produit est un dérivé du 2-nitroimidazole. Il est utilisé lors de la phase aiguë ainsi que de la phase chronique.

Le benznidazole, aux mêmes conditions expérimentales que le nifurtimox, ne produit pas de radicaux nitroanions ( $R-N O_2^{\circ-}$ ), anions superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ) et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Marr et Docampo, 1986). Cette drogue inhibe la respiration et la multiplication de *T. cruzi*, son effet trypanocide ne dépend pas de la présence de ces radicaux. Néanmoins, il conduirait à la réduction de certains métabolites qui peuvent interférer avec la synthèse des macromolécules par formation de liaisons covalentes et par d'autres interactions avec des composants cellulaires variés tels que l'ADN, les lipides et les protéines (Kierszenbaum, 1984; Marr et Docampo, 1986; Morello, 1988).

La dose de benznidazole administrée est de 5 à 10 mg/kg/jour, pendant 30 jours pour la phase aiguë et pendant 60 jours pour la phase chronique.

Les effets secondaires induits par cette drogue sont caractérisés par des troubles psychiques et neurologiques, des manifestations cutanées et des problèmes digestifs. De plus, des altérations chromosomiques peuvent survenir au niveau des lymphocytes (Marr et Docampo, 1986; de Castro, 1993).

Le mode d'action des composants nitrohétérocycliques est similaire dans divers systèmes biologiques. Pourtant, sur *T. cruzi* et sur des cellules de mammifères, le nifurtimox et le benznidazole semblent agir par des mécanismes différents (Marr et Docampo, 1986).

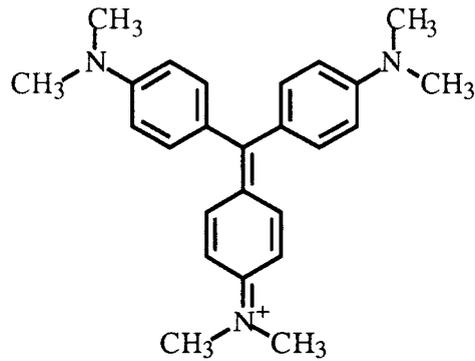


Les capacités curatives du nifurtimox et du benznidazole font l'objet de polémiques (Docampo et Moreno, 1985). La réponse à ces deux drogues semble varier suivant la région géographique. Ainsi, des patients traités au Chili et en Argentine répondent mieux que les individus infectés du Brésil.

### *c) Violet de gentiane*

Ce produit fait partie du groupe des triphénylméthanes, qui sont utilisés comme colorants biologiques. Le bleu de méthylène ou chlorure de méthylthioninium a joué un rôle important dans le développement de la chimiothérapie moderne. Ehrlich a employé des doses faibles de ce composant pour le traitement de patients atteints de malaria (Croft, 1994).

Le violet de gentiane ou hexaméthylpararosaniline est à la base de la classification de Gram par sa capacité à se fixer de façon irréversible aux bactéries à Gram +. Par ailleurs, il fut longtemps utilisé dans les milieux médicaux et dans l'industrie alimentaire comme agent antiseptique et mycostatique. L'effet toxique de ce colorant, actif contre des stades trypanomastigotes de *T. cruzi*, peut être dû à la formation d'un radical libre de tri (*p*-di-méthyl-aminophenyl) méthyl. Ce radical agira sur une molécule d'oxygène pour donner un autre radical libre de peroxy qui peut initier le processus de peroxydation lipidique (Docampo et Moreno, 1985; Morello, 1988).



Violet de gentiane ou Cristal violet

Le violet de gentiane est employé dans les banques de sang à une concentration de 250 µg/ml à 4°C pendant 24 à 48 heures pour éviter la transmission de la maladie de Chagas dans des régions endémiques et non-endémiques. Apparemment, aucun effet secondaire n'est observé chez l'homme à l'exception de quelques patients, chez lesquels une coloration bleue apparaît de façon transitoire au niveau de la peau et des muqueuses (Docampo et Moreno, 1985).



## **B. Aspects biologiques de résistance aux drogues.**

Les organismes pathogènes ont la capacité d'acquérir rapidement une résistance aux drogues. Cette caractéristique constitue un problème de plus en plus important pour le traitement des maladies infectieuses. C'est le cas des hôpitaux où l'on fait actuellement face à une émergence des infections postopératoires à *Staphylococcus*, devenu résistant aux antibiotiques classiques. La persistance du paludisme est liée à l'apparition de souches de *Plasmodium* chimiorésistantes aux chloroquines et autres composants utilisés dans le traitement et la prophylaxie (Peters, 1985).

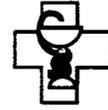
Il existe deux causes biologiques responsables du phénomène de résistance aux drogues:

- a) la sélection naturelle (ou artificielle)
- b) l'existence de voies métaboliques capables de détoxifier les composants xénobiotiques

### ***a) Sélection naturelle (ou artificielle)***

La sélection naturelle est un mécanisme directement lié aux facteurs du milieu (Lamotte, 1995). Les stress environnementaux sont capables de déclencher un taux plus élevé de types particuliers de mutations, qui n'auraient jamais survécu dans des conditions environnementales constantes, car elles auraient été trop extrêmes. Ainsi, ces transformations héréditaires brusques survivent et se répandent une fois que les conditions normales sont rétablies (Wills, 1991).

De cette manière, les individus d'une espèce qui possèdent des



caractéristiques adaptées à leur environnement se reproduiront avec plus de succès que d'autres individus. Puisque leur descendance hérite de ces caractéristiques, celles-ci finissent par devenir dominantes dans la population.

Les protozoaires parasites sont des micro-organismes eucaryotes qui, au cours de leur cycle, ont pour habitat naturel le milieu intérieur de l'hôte. De ce fait, au cours de son existence, le parasite devra développer un "dialogue moléculaire" avec les différents composants de l'hôte, tels que le système sanguin, le système immunitaire, le système endocrinien, etc. Cette continuelle interaction entre l'hôte et le parasite provoque une pression de sélection naturelle.

Toute modification des caractéristiques physico-chimiques du milieu, comme l'apport d'une drogue, entraîne un changement de l'écosystème du parasite. Cet événement occasionnel peut engendrer un réajustement du patrimoine héréditaire parasitaire. Ceci peut être considéré comme une sélection artificielle.

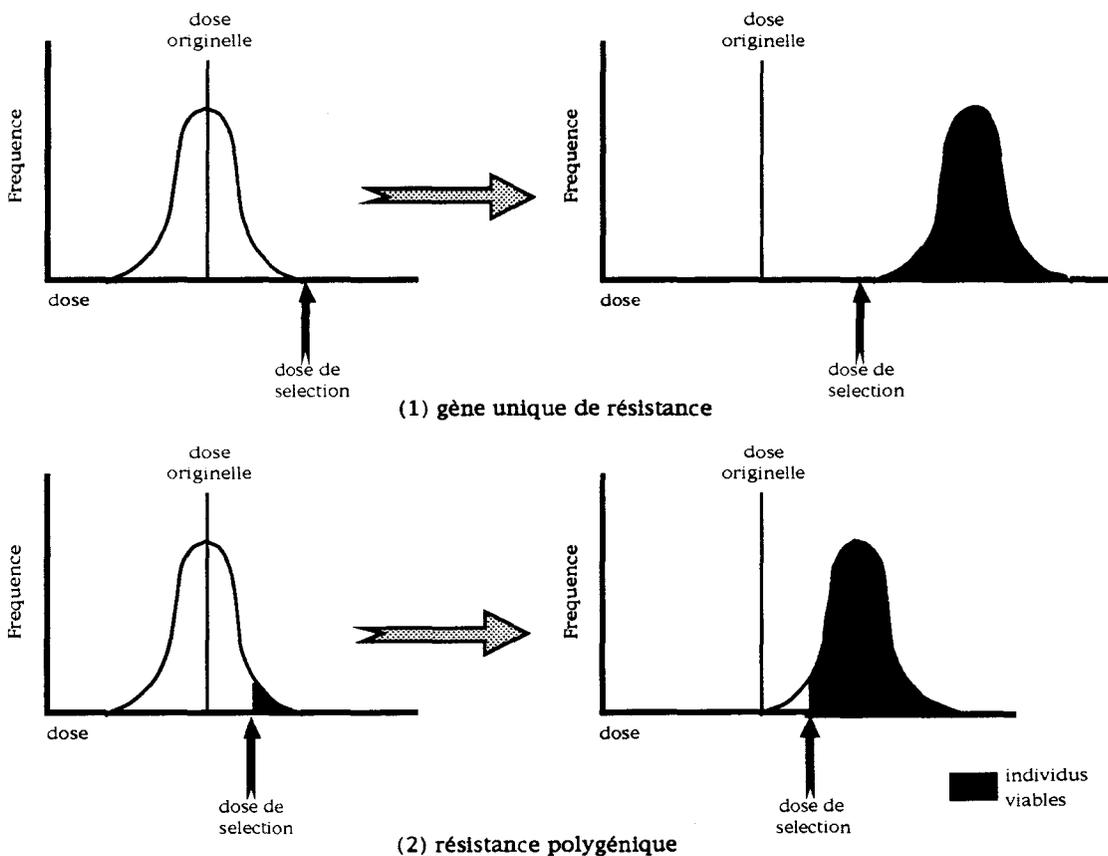
Les protozoaires ont un temps de génération très court, ce qui signifie que les transformations génétiques favorables, telle que la résistance aux drogues, sont sélectionnées.

La chimiorésistance d'un individu ou d'une population de parasites peut être liée à un allèle d'un gène donné ("monogénique") ou celui d'une combinaison d'allèles de différents gènes ("polygénique") (Bryant et Behm, 1989).

La résistance monogénique apparaît lorsqu'une population de parasites est soumise à des concentrations élevées et persistantes d'une drogue. De par l'effet de la pression sélective, les individus présentant des mutations qui confèrent la résistance émergeront, tandis que la population sensible s'éteindra (Figure ci-dessous).



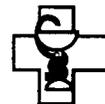
La résistance polygénique, quant à elle, survient lorsque les parasites sont mis en présence de concentrations faibles et non persistantes de drogue. Une partie de la population va disparaître, tandis que l'autre va survivre. Ce type de résistance se développe plus lentement que dans le cas précédent, car pendant un laps de temps, aura lieu une sélection des allèles dans un mélange génétique (Figure ci-dessous).



Développement de résistance aux drogues (après McKenzie, 1985)

L'apparition de souches de *T. cruzi* résistantes aux drogues est accentuée par différents facteurs:

- l'existence d'un nombre limité de drogues dans le traitement de la maladie de Chagas (nifurtimox et benznidazole),
- le traitement prolongé de la maladie, dû à la relative inefficacité de ces drogues,



c) l'analogie de la structure chimique de ces médicaments.

Ce dernier facteur signifie qu'un même mécanisme peut conférer une résistance à différentes drogues.

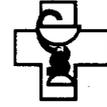
### ***b) Métabolisme xénobiotique***

Tout composé chimique exogène qui interagit avec la physiologie de l'organisme, en affectant sa fonction, est considéré comme une substance xénobiotique. La plupart de ces composés sont lipophiles et peuvent traverser la membrane cellulaire par diffusion passive non-ionique (Testa, 1995; Tracy et Waa, 1995).

Les médicaments font partie de ces substances xénobiotiques. Une fois à l'intérieur de l'organisme, ils sont capables d'induire des modifications physiologiques, sans apporter aucune valeur nutritionnelle.

Ainsi, certaines substances xénobiotiques sont éliminées sans modification, alors que d'autres peuvent être chimiquement réarrangées ou décomposées. La plupart sont biotransformées par des processus enzymatiques, impliquant par exemple, par les cytochromes P 450.

Le métabolisme des drogues et autres agents xénobiotiques s'accomplit en deux étapes: la phase I au cours de laquelle la substance xénobiotique est transformée en une molécule hydrosoluble par réactions d'oxydation (soustraction d'électrons, déshydrogénation ou oxygénation), de réduction (addition d'électrons, hydrogénation ou perte d'oxygène) et/ou d'hydratation-déshydratation (hydrolyse, addition ou déplacement de molécules d'eau). Pendant cette phase, un groupe fonctionnel polaire (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, etc.) est introduit dans la molécule.

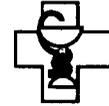


La phase II ou phase de conjugaison, est le résultat d'une liaison covalente entre le groupe fonctionnel polaire du substrat xénobiotique et une molécule endogène.

Le résultat de ce métabolisme est la biotransformation de composants xénobiotiques en molécules solubles dans l'eau pouvant être éliminées facilement par la cellule.

Alors que le métabolisme des xénobiotiques est synonyme de détoxification, le produit chimique final peut être parfois toxique pour la cellule.

La conjugaison des composants lipophiles avec le glutathion est une des voies les plus importantes du métabolisme xénobiotique chez les helminthes et protozoaires parasites.



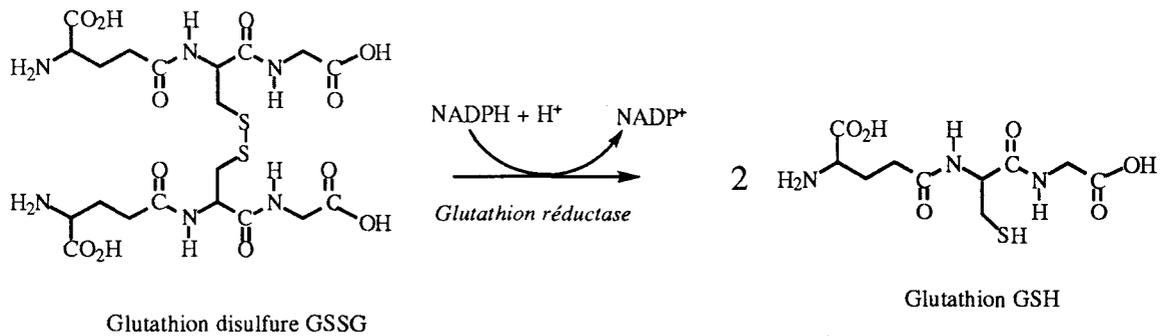
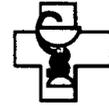
---

## C. Glutathion

### 1. Généralités

Le glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine; GSH) est un tripeptide de faible poids moléculaire. Il est largement répandu dans la nature et possède plusieurs fonctions importantes dans le métabolisme cellulaire au niveau de la catalyse et du transport. Le GSH protège la cellule du stress oxydatif et intervient dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques. Il agit aussi comme cofacteur de plusieurs enzymes, par exemple: Glutathion-S-transférase, Glutathion-peroxidase, etc. En outre, le GSH peut former des conjugués avec une grande variété de composants d'origine endogènes ou exogènes, comme certains xénobiotiques. Il intervient également dans le stockage et le transport de molécules de cystéine (Meister, 1995; Testa, 1995).

Le GSH peut réagir de différentes façons. Les propriétés nucléophiles du groupement thiol font du GSH un bon agent conjuguant. De plus, le GSH peut agir comme agent réducteur ou oxydant (réducteur de quinones, nitrates organiques, peroxides et radicaux libres ou oxydant de superoxyde). Il réagit aussi de façon non enzymatique dans diverses réactions redox. Le GSH joue également le rôle de cofacteur dans plusieurs réactions enzymatiques, comme dans la conjugaison catalysée par la Glutathion-S-transférase et la réaction de réduction du peroxyde catalysée par la Glutathion-peroxidase. Au cours de ces réactions, du Glutathion disulfure (GSSG) est formé et la régénération du GSH est catalysée par une flavoprotéine NADPH-dépendante, la Glutathion réductase (Figure ci-dessous) (Testa, 1995).



On trouve des molécules analogues au GSH chez les plantes comme le  $\gamma$ -Glu-Cys- $\beta$ -Ala ou le  $(\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly ( $n=3-12$ ), chez les micro-organismes (*Escherichia coli*) comme la  $N_1$ -Glutathionyl spermidine, et chez les parasites (Trypanosomatides) comme le  $N_1, N_8$ -bis(Glutathionyl) spermidine appelé Trypanothion (Meister, 1988). Ce dernier composant est un analogue du GSH des mammifères. Plusieurs laboratoires s'intéressent au métabolisme de cette molécule, car l'enzyme qui catalyse la réduction du Trypanothion disulfure en présence du cofacteur NADPH, la Trypanothion réductase, constitue une cible chimiothérapeutique potentielle pour le traitement des trypanosomiasés.

## 2. Trypanothion

La comparaison des processus métaboliques entre les différentes formes de vie constitue une partie essentielle de l'étude et de l'élaboration des agents chimiothérapeutiques.

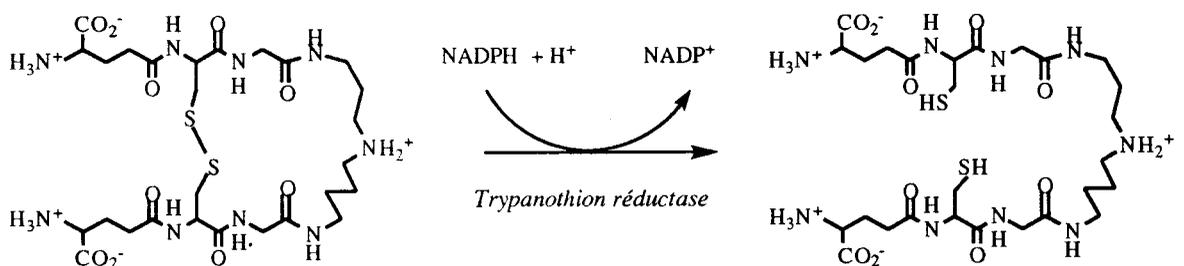
La conjugaison du GSH et de la spermidine (polyamine), donne comme résultat une molécule spécifique des Trypanosomatidae, appelée trypanothion ( $N_1, N_8$ -bis(glutathionyl) spermidine;  $T(SH)_2$ ), qui représente plus de 70% du GSH total intracellulaire chez le parasite. Ce niveau est maintenu constant par la présence d'une trypanothion réductase. Cette enzyme, ainsi que la molécule de



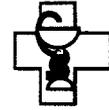
trypanothion, joue un rôle similaire à celui de la glutathion réductase et du glutathion chez les mammifères, maintenant un environnement intracellulaire réducteur (Fairlamb, 1991; Smith et al., 1991; Fairlamb et Cerami, 1992; Marr et Ullman, 1995).

Le T(SH)<sub>2</sub> se fait en deux étapes, faisant intervenir deux enzymes, la glutathionylspermidine synthétase ATP/Mg<sup>+2</sup>-dépendante et la trypanothion-synthétase ATP/Mg<sup>+2</sup>-dépendante. La première étape, catalysée par la glutathionylspermidine synthétase, consiste en la fixation d'une molécule de spermidine sur le carboxyl terminal du GSH. Le produit de cette réaction donne deux molécules intermédiaires, le N<sub>1</sub> et le N<sub>8</sub>-glutathionylspermidine. Lors de l'étape suivante, la trypanothion-synthétase catalyse la réaction de couplage d'une deuxième molécule de GSH avec l'amine terminale, une des molécules intermédiaires, donnant le thiol T(SH)<sub>2</sub> (Murgolo et al., 1990; Fairlamb, 1991).

Au niveau cellulaire, le trypanothion disulphide (T(S)<sub>2</sub>), forme oxydée, est rapidement réduit en T(SH)<sub>2</sub> par une réaction enzymatique catalysée par la trypanothion-réductase NADPH-dépendante. Ce processus est essentiel pour le maintien du potentiel redox chez le parasite (Fairlamb, 1991) (Figure ci-dessous).



La glutathion-réductase de l'hôte et la trypanothion-réductase du



parasite sont spécifiques pour un substrat qui leur est propre (Henderson et Fairlamb, 1987; Fairlamb, 1991). Cette caractéristique enzymatique est connue en enzymologie comme la *sélectivité* d'une réaction métabolique liée à une enzyme *spécifique*.

Le métabolisme du  $T(SH)_2$  fait intervenir trois enzymes: la glutathionylspermidine synthétase, la trypanothion-synthétase et la trypanothion-réductase. Ces enzymes constituent des cibles potentielles pour la chimiothérapie. Jusqu'à présent, les efforts de l'industrie pharmaceutique se sont orientés vers l'étude de l'inhibition de la trypanothionréductase. Cette inhibition peut être obtenue soit en modifiant la structure de certains médicaments déjà existants pour les rendre plus efficaces, soit en caractérisant de nouvelles molécules.

Récemment, la glutathionylspermidine synthétase a également fait l'objet d'études d'inhibition par des dérivés du GSH. Cependant l'inhibition obtenue avec ces dérivés n'est que modérée (Verbruggen et al., 1996)



## D. Produits naturels

Pendant des siècles, l'homme a utilisé de manière traditionnelle des produits naturels pour guérir des maladies infectieuses. Les grecs et les romains ont élaboré des textes médicaux décrivant des plantes d'intérêt pharmacologique. Deux cent années avant J.C., Soranus, médecin, recommandait l'administration par voie orale de sève de silphion (genre *Ferula*) comme contraceptif (Holland, 1994). Les peuples sibériens ont utilisé des insectes pour le traitement de diverses maladies. Par exemple, ils conseillaient l'ingestion d'araignées et de vers blancs pour combattre la stérilité, la graisse de scarabée noir pour éviter l'hydrophobie, le cafard écrasé pour traiter les abcès et hernies, les vers rouges macérés et mis en contact de la lésion pour le rhumatisme, le fiel de brochet pour soigner les maladies des yeux, etc. (Lévi-Strauss, 1962).

La plupart des plantes produisent des composants secondaires tels que des alcaloïdes, terpènes et tannins, comme moyen de défense contre des prédateurs, des parasites et des virus. La structure moléculaire de ces composants pourrait servir comme modèle pour la synthèse de nouveaux médicaments.

Lévi-Strauss (1962) avançait que les espèces animales et végétales ne sont pas connues, pour autant qu'elles sont utiles: elles sont décrétées utiles ou intéressantes, parce qu'elles sont d'abord connues.

Les micro-organismes, les champignons, les plantes et les animaux, en particulier les espèces qui sont venimeuses, représentent une source importante de molécules chimiques et organiques, qui font l'objet de travaux considérables en médecine clinique et dans l'industrie pharmaceutique. Quelques exemples: le Captopril qui est un



inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II (vasoconstricteur) isolé du venin de serpent (*Bothrops jararaca*); le Cromoglycate (de sodium) possède des propriétés anti-allergiques, c'est un produit dérivé de graines (*Ammi visnaga*), et la Cyclosporin A est un agent immunosuppresseur isolé du champignon (*Trichoderma polysporum*).

Actuellement, une trentaine de produits naturels d'origine marine sont en cours d'expérimentation et font l'objet d'un intérêt grandissant de la part des grandes compagnies pharmaceutiques comme Rhône-Poulenc (France), Ciba-Geigy (Etats Unis), Schering Plough (Etats Unis), Astra (Suède) et autres (Jeanblanc et Delesalle, 1996).

De plus, les avancées techniques réalisées ces dernières années en biologie moléculaire, la conception de drogues par la modélisation moléculaire, la biotechnologie et l'informatique, permettront l'élaboration et l'étude de nouveaux composants thérapeutiques dérivés de ces composants naturels.

Les venins d'origine animale, et en particulier, ceux produits par les serpents, sont à la base de nombreuses études dans le domaine de la physiologie, la chimie et l'immunologie. Ainsi, la capacité des certains composants du venin à modifier ou perturber le fonctionnement du système physiologique est étudiée. Les chimistes, quant à eux, tentent d'isoler, purifier et caractériser des substances bioactives. Enfin la réponse immunitaire induite par des toxines est analysée dans le but de développer une sérothérapie spécifique et efficace (Stocker, 1990; Chippaux et Goyffon, 1991; Hawgood et Bon, 1991).



## 1. Les serpents

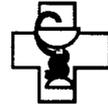
Les serpents appartiennent à l'ordre Squamata, au sous-ordre Ophidia, dont on connaît environ 3300 espèces classées dans 11 familles. La plupart des serpents venimeux appartiennent à quatre familles: Elapidae (cobras, mambas, bungares, etc.), Hydrophiidae (serpents marins), Viperidae (vipères et crotales) et Atractaspididae (serpents taupe) (Meier, 1990).

Les serpents sont des reptiles (vertébrés, amniotes), poïkilothermes (sang froid), dont le coeur possède des ventricules mal séparés. La peau est presque dépourvue de glandes et recouverte d'écailles épidermiques. Ils se caractérisent par leur forme allongée d'aspect non annelé et l'absence presque totale de membres.

L'appareil venimeux des serpents comprend essentiellement deux glandes dérivées des glandes salivaires de la mâchoire supérieure, qui synthétisent le venin. Le système d'injection, constitué par des dents modifiées en crochets, permet à l'animal d'inoculer son venin dans la chair de la proie, ou éventuellement, de l'individu agresseur.

Les venins de serpent ont pour objectif primordial d'immobiliser ou tuer la proie et de commencer la digestion. La nécessité de ces fonctions se conçoit du fait que les serpents sont incapables de saisir, de porter ou de déchiqueter leur proie.

Jusqu'au présent, près de 400 protéines ont pu être isolées et caractérisées à partir de venins de serpents. Plusieurs de ces composants ont des applications pratiques dans la recherche biomédicale ou sont employés comme des outils de diagnostic (Stocker, 1990).



## 2. Le venin de serpent: généralités

Les venins de serpent sont vraisemblablement les fluides sécrétés dont la concentration est la plus élevée chez les organismes vertébrés (15% à 50%). Ce sont des mélanges hétérogènes de substances complexes. Cette complexité est due à leurs très nombreux constituants, à leurs activités biochimiques et pharmacologiques souvent multiples et plus ou moins bien définies (Stocker, 1990).

Le venin est expulsé à l'extrémité des crochets sous forme de gouttelettes visqueuses, jaune-ambéré, parfois blanchâtre. Sa saveur est légèrement astringente, sa viscosité relative varie de 1,5 à 2,5, sa densité de 1030 à 1050 et son pH en eau distillée de 5,5 à 7.

Le venin, à l'état sec, se présente sous forme de paillettes jaune-ambrées ou blanchâtres lorsqu'il est cristallisé, ou d'amas poudreux si celui-ci est lyophilisé. Les venins desséchés sont très stables à condition d'être conservés à l'abri de la chaleur et surtout de l'humidité. Les solutions de venins (de même que les venins frais dont la dessiccation est insuffisante ou tardive) sont instables et subissent une autodigestion. Leurs activités toxiques et enzymatiques sont rapidement détruites à pH alcalin et sous l'effet des oxydants (permanganate, hypochlorites). Divers produits (bile, savon) atténuent ou suppriment en quelques jours certaines de leurs propriétés; le formol et le glutaraldéhyde en milieu tamponné les transforment en "toxoides" antigéniques alors que les solvants organiques les précipitent et les inactivent. Le degré d'hydratation des venins frais est de 70 à 80%. Les composants organiques représentent environ 90% du poids sec, dont 70 à 75% sont des polypeptides de faible poids moléculaire et des protéines. La portion restante inclut des fractions non protéiques d'où sont isolés des petits



---

peptides, des phospholipides, des nucléotides, des nucléosides, des hydrates de carbone, des acides aminés et des flavines (Stocker, 1990).

L'analyse élémentaire démontre la présence de cations : zinc, calcium, potassium, cuivre, fer, sodium, magnésium et manganèse à des taux faibles et variables. La plupart d'entre eux sont non dialysables, ce qui prouve qu'ils sont intimement liés à des molécules protéiques, intervenant comme cofacteurs.

### **3. Composition biochimique des venins**

Classiquement, les constituants protéiques des venins sont repartis en deux grands groupes selon leurs structures moléculaires, leurs propriétés chimiques ou leurs activités pharmacologiques: toxines et enzymes (Karlsson, 1979 et Iwanaga, 1979). Cependant, la distinction entre ces 2 grands groupes n'est pas toujours bien délimitée.

#### ***a) Toxines***

Les toxines sont des polypeptides ou des protéines qui se fixent sur des récepteurs cellulaires spécifiques inhibant ou perturbant le fonctionnement normal de la cellule. La plupart possèdent une quantité considérable de ponts disulfure. Cette propriété confère aux toxines une grande stabilité en conditions dénaturantes. Elles sont classées en plusieurs catégories d'après leurs constitutions chimiques ou leurs propriétés pharmacologiques. Quelques-unes de ces toxines provenant de venins d'espèces ou de familles différentes sont communes dans leur mode d'action, sans toutefois être identiques, d'autres sont plus ou moins spécifiques d'une espèce particulière (Annexe A).



## ***b) Enzymes***

Une trentaine d'enzymes, pour la plupart des hydrolases, ont été isolées des venins de divers serpents. Une douzaine d'entre elles, avec quelques différences de structure moléculaire, sont communes à tous les venins, les autres sont spécifiques de certaines familles ou groupes d'espèces. C'est ainsi que l'acétylcholinestérase est caractéristique des venins d'Elapidae, alors que l'arginine-ester-hydrolase, la kinogénase et d'autres enzymes intervenant sur la coagulation sanguine ne sont trouvées que dans les venins de Viperidae. Les venins de Viperidae et de Crotalidae sont beaucoup plus riches en enzymes que les venins des Elapidae.

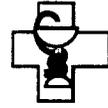
Certains venins contiennent des facteurs soit inhibiteurs, soit activateurs d'autres enzymes. Un grand nombre de ces facteurs, obtenus à l'état pur, sont couramment utilisés comme réactifs biochimiques et plusieurs d'entre eux sont employés en thérapeutique et en chirurgie. En règle générale, ces enzymes sont caractérisées par leurs poids moléculaires élevés (5 à 13 kDa) et leur faible toxicité.

Les enzymes sont habituellement classées selon leurs propriétés biochimiques (Annexe B).

## **4. Variabilité dans la composition des venins de serpents**

Les venins de serpents sont caractérisés par une grande variabilité dans leur composition (Chippaux et al., 1991). De nombreuses études ont porté sur les différences existant entre les venins de serpents appartenant à différentes familles.

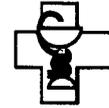
L'utilisation de paramètres immunologiques a montré qu'il y a une



grande quantité d'antigènes communs mais les études portant sur les activités biologiques et sur la biochimie des venins indiquent qu'il existe des différences importantes. Ainsi, les venins de Viperidae et de Crotalidae présentent plutôt une action hémotoxique tandis que les morsures d'Elapidae se traduisent par une forte neurotoxicité. Il a également montré une hétérogénéité des venins de serpents d'une même famille mais appartenant à des genres différents (Saint-Girons et Detrait, 1978).

La composition des venins de serpents peut varier entre individus d'une même espèce. Le venin de *Vipera ammodytes* est soit jaune soit blanc. Une forte activité L-amino-oxydase dans les venins jaunes a été mise en évidence, tandis que les autres activités enzymatiques restent identiques (Kornalike et Master, 1964). De plus, chez un même individu, une protéine peut exister sous de multiples formes. Elles diffèrent seulement de quelques acides aminés. Les différentes isoformes de la crotoxine en sont un exemple (Faure et Bon, 1987; Faure et al., 1994). Plusieurs paramètres peuvent influencer la variation de la composition et la toxicité des venins de *Vipera russeli* issus de lieux géographiques différents (Jayanthi et Gowda, 1988) qui se traduisent par des symptomatologies différentes (Warrell, 1985). Les saisons peuvent également avoir une influence sur la composition des venins (Detrait et Duguy, 1966). En revanche, l'influence de l'âge et du sexe de l'animal sur la composition du venin est peu marquée. Des travaux récents concernant l'espèce *Calloselasma rhodostoma* montrent qu'il existe une relation directe entre l'alimentation des serpents et la composition protéique du venin (Daltry et al., 1996).

# RESULTATS



## II. Résultats

### A. Substances naturelles

#### 1. Article 1



Pergamon

0041-0101(94)E0046-A

Toxicol. Vol. 32, No. 8, pp. 875-882, 1994  
Copyright © 1994 Elsevier Science Ltd  
Printed in Great Britain. All rights reserved  
0041-0101/94 \$7.00 + 0.00

GROWTH INHIBITION OF *TRYPANOSOMA CRUZI* AND  
*LEISHMANIA DONOVANI INFANTUM* BY DIFFERENT SNAKE  
VENOMS: PRELIMINARY IDENTIFICATION OF PROTEINS  
FROM *CERASTES CERASTES* VENOM WHICH INTERACT  
WITH THE PARASITES

RODOLFO FERNANDEZ-GOMEZ,<sup>1</sup> HALIM ZERROUK,<sup>2</sup> FATIMA SEBTI,<sup>2</sup> MARC LOYENS,<sup>1</sup>  
ABDALLAH BENSLIMANE<sup>2</sup> and M. ALI OUAISSI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomatidae, INSERM U415, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Pr. A. Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France; and <sup>2</sup>Service de Biochimie, Institut Pasteur, Place Charles Nicolle, B.P. 120, Casablanca, Morocco

Le Nifurtimox et le Benznidazole sont peu efficaces pour le traitement de la maladie de Chagas, de plus l'élaboration de nouvelles drogues trypanocides nécessite un investissement élevé qui n'est pas compatible avec les réalités économiques des pays endémiques. La recherche de substances d'origine naturelle et donc de moindre coût, s'avère primordiale dans la lutte contre les maladies infectieuses et plus particulièrement contre la Trypanosomiase américaine (Brenner, 1979; Kierszenbaum, 1984; Gutteridge, 1987; Marsden, 1988; De Castro, 1993).

Dans ce contexte, ce travail réalisé en collaboration avec H. Zerrouk de l'Institut Pasteur de Casablanca, a permis d'évaluer l'activité de différents venins provenant d'espèces distinctes d'animaux.

Les venins de trois espèces de serpents, *Cerastes cerastes*, *Naja haje* et *Vipera lebetina* ont montré un effet inhibiteur de la multiplication d'épimastigotes en culture.

Nous avons corrélés l'inhibition de la multiplication d'épimastigotes par le test de l'incorporation de la thymidine  $^3\text{H}$ , à la mortalité d'épimastigotes, mise en évidence par des colorants vitaux (Bleu Trypan).

**Les résultats obtenus sont les suivants:**

- ◆ Les venins de *C. cerastes* et *N. haje* induisent une inhibition de la multiplication de la forme épimastigote, quantifiée par incorporation de thymidine  $^3\text{H}$ . En revanche, le venin de *V. lebetina* s'avère moins efficace. Cette inhibition de la prolifération est dose-dépendante.
- ◆ D'autres venins, notamment d'araignées et de scorpions, ont été testés, mais aucun de ces produits n'a montré d'activité.

♦ Les molécules bioactives vis-à-vis de la forme épimastigote, présentes dans les venins, sont thermolabiles.

Notre travail s'est focalisé sur le venin de *C. cerastes* suite à un rapport de l'OMS (OMS, 1981) indiquant sa faible toxicité comparée à celle de *N. haje*.

♦ L'étude comparative de l'incorporation d'uridine  $^3\text{H}$  par les différents stades du cycle parasitaire, en particulier, les formes présentes chez l'hôte vertébré: trypomastigote et amastigote, met en évidence l'action du venin de *C. cerastes* sur les précurseurs des ARNs.

♦ L'analyse par autoradiographie d'un gel SDS-PAGE d'épimastigotes mis en contact avec du venin de *C. cerastes* marqué à l'iode ( $^{125}\text{I}$ ) a révélée que des protéines de masse moléculaire de 30 à 40 kDa sont associées aux composants parasitaires. Par ailleurs, nous observons que la molécule de 40 kDa est concentrée chez le parasite, alors qu'elle apparait sur l'autoradiographie comme un composant mineur du venin.

Des résultats similaires ont été obtenus sur le modèle *Leishmania*.



## GROWTH INHIBITION OF *TRYPANOSOMA CRUZI* AND *LEISHMANIA DONOVANI INFANTUM* BY DIFFERENT SNAKE VENOMS: PRELIMINARY IDENTIFICATION OF PROTEINS FROM *CERASTES CERASTES* VENOM WHICH INTERACT WITH THE PARASITES

RODOLFO FERNANDEZ-GOMEZ,<sup>1</sup> HALIM ZERROUK,<sup>2</sup> FATIMA SEBTI,<sup>2</sup> MARC LOYENS,<sup>1</sup>  
ABDALLAH BENSLIMANE<sup>2</sup> and M. ALI OUAISSI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomatidae, INSERM U415, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Pr. A. Calmette, B.P. 245, 59019 Lille Cedex, France; and <sup>2</sup>Service de Biochimie, Institut Pasteur, Place Charles Nicolle, B.P. 120, Casablanca, Morocco

(Received 17 December 1993; accepted 17 March 1994)

R. FERNANDEZ-GOMEZ, H. ZERROUK, F. SEBTI, M. LOYENS, A. BENSLIMANE and M. A. OUAISSI. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. *Toxicon* 32, 875-882, 1994.—Venom from three different snake species was tested *in vitro* against the protozoan parasites *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum*. Two of them, *Cerastes cerastes* and *Naja haje*, exerted a significant growth inhibition of *T. cruzi* and *L. d. infantum* parasites. Heating of the venoms abolished their activity, suggesting that the active factors are thermolabile. Incubation of parasites with <sup>125</sup>I-labelled *C. cerastes* venom proteins allowed preliminary identification of components which interact preferentially with the pathogens.

### INTRODUCTION

CHAGAS' disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is estimated to affect 16-18 million people in Central and South America (MONCAYO, 1993). Treatment of patients is based on the use of drugs such as Nifurtimox and Benznidazole. However, these products exhibit some toxic effects on humans and have resulted in the cure of few chronic chagasic patients (MORELLO, 1988). In endemic areas, transmission by blood transfusion is of growing significance (PINTO DIAS and BRENER, 1984). The only way to treat the blood sample is the use of gentian violet, which colours the blood sample and therefore is uncomfortable for the transfused patients. However, irradiation with visible light and addition of ascorbate allow a reduction in the dose and in the time of contact with the blood (DO CAMPO *et al.*, 1988). Several heterocyclic analogues of crystal violet have been shown to have an effect on epimastigote (DE DIEGO *et al.*, 1988). Furthermore,

\* Author to whom correspondence should be addressed.

the pharmaceutical industry has little interest in this area, since any research programme would be very expensive, and not justifiable on a commercial basis (GUTTERIDGE, 1987).

Leishmaniasis is caused by the protozoan parasite *Leishmania* spp., which is transmitted to the vertebrate-host by the bite of the phlebotomine sandfly. The different pathological manifestations vary with the species which are widely distributed in tropical and subtropical areas and also are commonly found in the Mediterranean basin. The extent and severity of this group of diseases are important health problems.

In humans, parasites from the *L. donovani* complex cause visceral leishmaniasis or Kala-azar (ZUCKERMAN and LAINSON, 1977). In Africa, *L. donovani* also infects adults but frequently presents a high resistance to antimonial treatment. Mediterranean kala-azar caused by *L. d. infantum* especially affects children, and South American visceral leishmaniasis caused by *L. d. chagasi* is a disease of both adults and children. Geographical and clinical data have been used in the past to classify the organisms causing the visceral disease.

The chemotherapy is limited to the use of pentavalent antimonials such as sodium stibogluconate (Pentostan), *N*-methylglucamine (Glucantime), amphotericin B or pentamidine. These drugs are toxic and difficult to administrate because of their long-term treatment and high cost (CROFT, 1986; OUELLETTE and PAPADOPOULOU, 1993; MODABBER, 1993).

In addition, even in successfully treated patients the presence of the parasite has been reported using the polymerase chain reaction with the parasite specific oligonucleotide probes (GUEVARA *et al.*, 1993).

Thus, research into possible chemotherapeutic agents from natural sources could be an alternative way to be developed. Indeed, natural compounds are usually available and could provide low cost and stable drugs.

Snake venoms contain a number of components such as neurotoxins, cytotoxins, myotoxins, proteases and nucleases. Most venomous snakes belong to four families, the Elapidae (cobras, mambas, bungares, coral snakes); the Hydrophiidae (sea snakes), the Viperidae (vipers and crotals), and the Atractaspididae (mole-snakes). A number of bioactive compounds has been isolated from snake venoms (MENEZ, 1993). Moreover, studies have shown that a group of basic low mol. wt proteins from Cobra venom (*Hemachatus hemachatus*) had lytic activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (ALLOF-HIRSCH *et al.*, 1968). Antibacterial effect of viperid venoms and L-amino acid oxidase, purified from venom of *Crotalus adamanteus*, have also been reported (SKARNES, 1970). Moreover, proteins termed LA01 and LA02 purified from *Pseudechis australis* have been shown to exert antibacterial activity associated with L-amino acid oxidase activity (STILES *et al.*, 1991). In the case of protozoan parasites, no attempts have been made to examine the possible lytic activity of the snake venom factors.

In the present study, we have analysed the inhibitory effect of three different snake venoms, *Cerastes cerastes*, *Naja haje* and *Vipera lebetina*, on parasite growth *in vitro*, and made comparison with the activity of benzimidazole, a drug used for the treatment of acute Chagas disease. Similar studies have been made with *L. d. infantum* parasites, and the drug used was Chlorimipramine (ZILBERSTEIN and DWYER, 1984). The use of <sup>125</sup>I-labelled venom proteins allowed us to identify two major components which preferentially interact with the parasites.

MATERIALS AND METHODS

*Trypanosoma cruzi* epimastigotes and *L. d. infantum* promastigotes were cultured for 4 days at 26°C in glucose-lactalbumin serum-haemoglobin medium (GLSH) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum and antibiotic (CORNETTE, 1988). Trypomastigotes were obtained in tissue culture by weekly infection of 3T3 fibroblasts, as described previously (OUAISSI *et al.*, 1986). The amastigote forms were obtained by centrifugation on metrizamide gradient. *Leishmania* intracellular amastigotes were obtained by *in vitro* infection of J774 macrophage cell line, according to a previously described method (RIZVI *et al.*, 1985). The venoms were prepared in the Pasteur Institute of Morocco, Biochemistry Laboratory Research (ZERROUK *et al.*, 1991). The parasites were washed and aliquots ( $5 \times 10^5$  or  $10^6$ ) were transferred to 96-well microplates with the venom or drug (384  $\mu$ M of benznidazole and 50  $\mu$ M of chlorimipramine with *T. cruzi* epimastigotes and *L. d. infantum* promastigotes, respectively) in a total volume of 200  $\mu$ l and pulsed with  $^3$ H-thymidine (0.5  $\mu$ l was added to give 0.5  $\mu$ Ci/well). Control cultures consisted of parasites incubated in the presence of culture medium alone. In the case of amastigotes and trypomastigotes, the cultures were pulsed with  $^3$ H-uridine (0.5  $\mu$ l was added to give 0.5  $\mu$ Ci/ml). After different incubation times, parasites were harvested in an automated sample harvester. The filter discs were dried and placed in scintillation fluid and counted in a scintillation counter. Results are expressed as the radioactivity incorporated. All cultures were set up in triplicate. Results were compared using the Student's *t*-test.

The *C. cerastes* venom proteins were iodinated by the Chloramine-T method using 100  $\mu$ Ci of  $^{125}$ I (OUAISSI, 1992). Labelled proteins ( $3 \times 10^6$  cpm) were incubated with the parasites ( $10^6$  or  $10^7$ ) at 26°C for 3 hr. Parasites were then extensively washed, and the pellets were dissolved and subjected to SDS-PAGE and autoradiography.

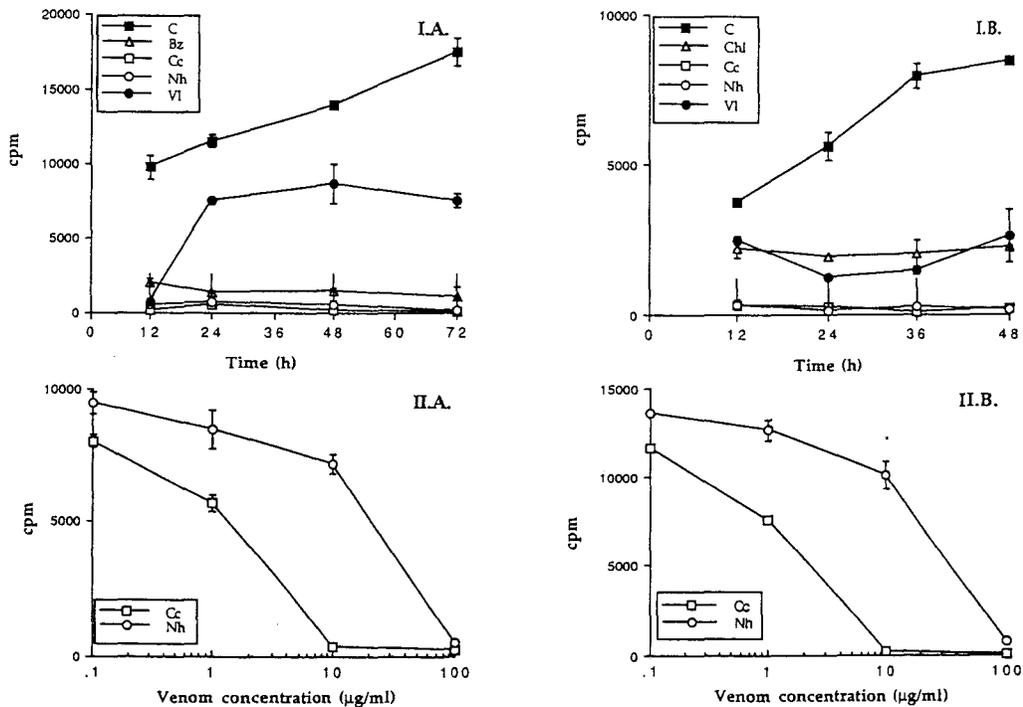


FIG. 1. EFFECT OF DIFFERENT SPECIES SNAKE VENOMS (100  $\mu$ g/ml) AND DRUGS ON PARASITE GROWTH *in vitro*.

I.A. *T. cruzi* epimastigotes; I.B. *L. d. infantum* promastigotes, *Cerastes cerastes* (Cc), *Naja haje* (Nh), *Vipera lebetina* (VI), benznidazole (Bz), chlorimipramine (Chl) and culture medium (C). II. A dose-dependent inhibition of parasites growth by *Cerastes cerastes* (Cc) and *Naja haje* (Nh) venoms. A. *T. cruzi* epimastigotes; B. *L. d. infantum* promastigotes.

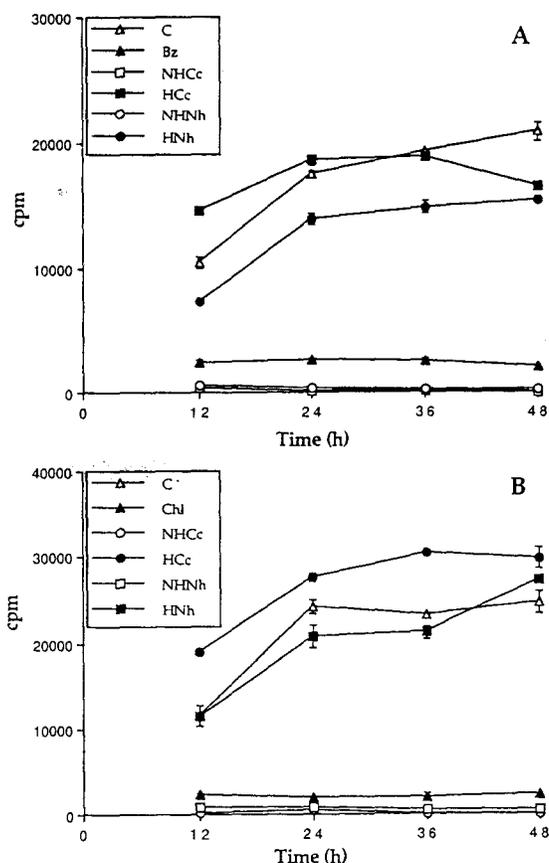


FIG. 2. EFFECT OF HEAT-TREATMENT OF SPECIES SNAKE VENOMS ON THEIR ACTIVITY ON PARASITE GROWTH. A. *T. cruzi* epimastigotes; B. *L. d. infantum* promastigotes. NHCc and HCc, non-heated and heated *C. cerastes* venom; NHNh and HNh, non-heated and heated *N. haja* venom, benznidazole (Bz), chlorimipramine (Chl) and culture medium (C).

#### RESULTS AND DISCUSSION

As shown in Fig. 1.I.A, the venoms from *N. haja* and *C. cerastes* at 100  $\mu\text{g/ml}$  exerted a strong inhibitory effect on parasite multiplication as measured by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation (significant difference between control cultures and venom-treated parasites;  $P < 10^{-5}$ ,  $P < 10^{-3}$ , at 24 hr and 72 hr of culture, respectively). The activity is in the same order as benznidazole (100  $\mu\text{g/ml}$ ). The venom from *V. lebetina* had only a moderate effect. Moreover, the level of inhibition at different incubation times varied with the venom concentration used. Furthermore, a dose-dependent inhibition was obtained when using different concentrations of the venoms. Indeed, as shown in Fig. 1.II, the venoms exerted a strong inhibitory effect on parasite multiplication. Other venoms, particularly from scorpion and spiders (*Leiurus quinquestriatus hebraeus*, *Agelena gracilis* and *A. lobiryntica*) have also been tested. None of them had any significant effect against *T. cruzi*.

Having found this inhibitory activity of the venoms on *T. cruzi* growth, we extended our investigation to the *Leishmania* model. As shown in Fig. 1.I.B *C. cerastes* and *N. haja* venoms exerted an inhibitory activity on *Leishmania* promastigote multiplication. Inhi-

bition of growth induced by the venoms was higher than that observed with chlorimipramine (50  $\mu$ M), a drug known to inhibit the growth of *L. d. infantum* parasites (significant difference between control cultures and venom-treated parasites;  $P < 10^{-3}$ ,  $P < 10^{-5}$ , at 24 hr and 48 hr of culture, respectively). In contrast to *T. cruzi*, *V. lebetina* venom had an inhibitory activity similar to that observed with chlorimipramine (no

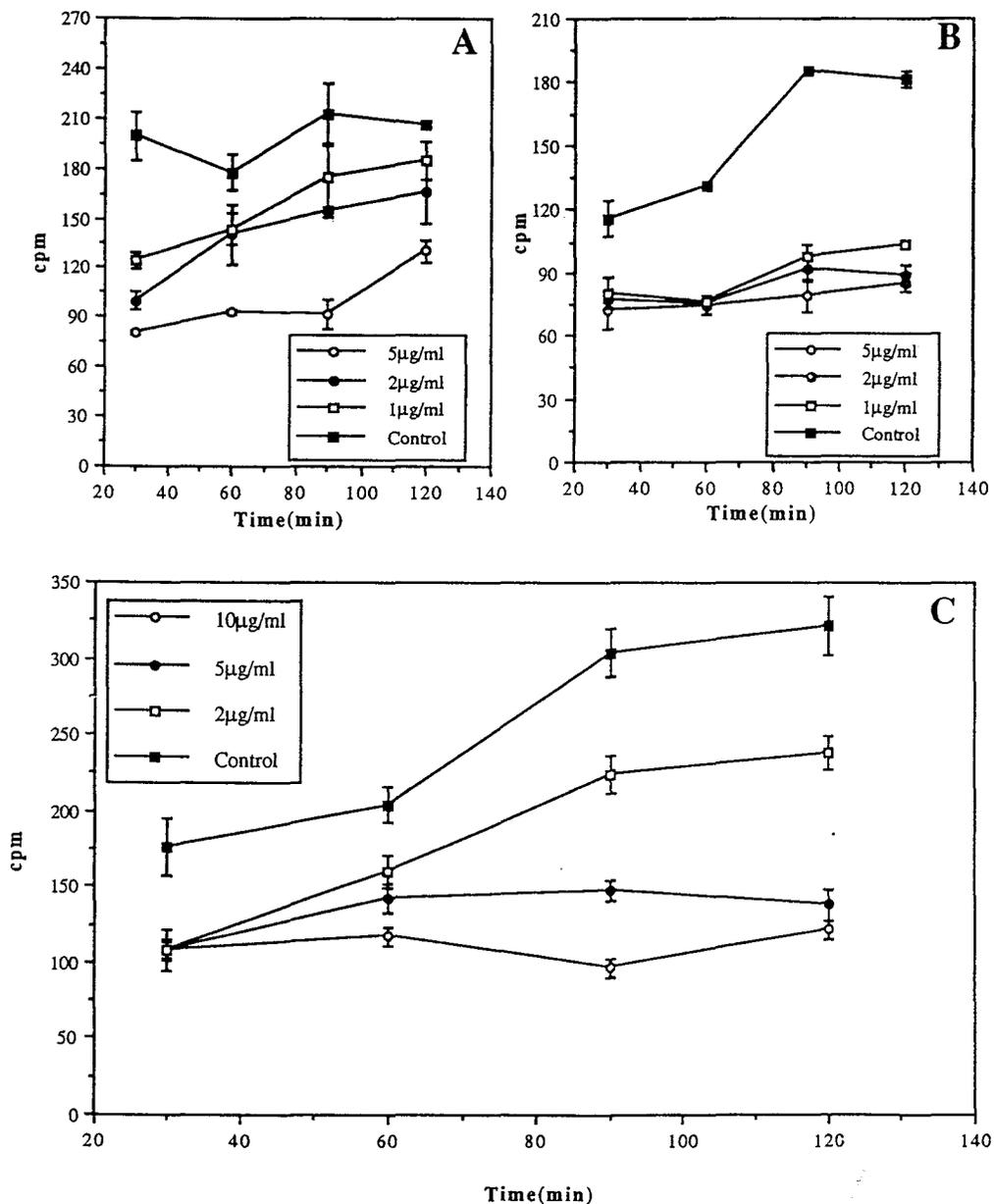


FIG. 3. DOSE-DEPENDENT INHIBITION OF  $^3$ H-URIDINE INCORPORATION BY *T. cruzi* (A) AND *Leishmania* (B) AMASTIGOTES AND *T. cruzi* TRYPOMASTIGOTES (C), CAUSED BY *C. cerastes* VENOM.

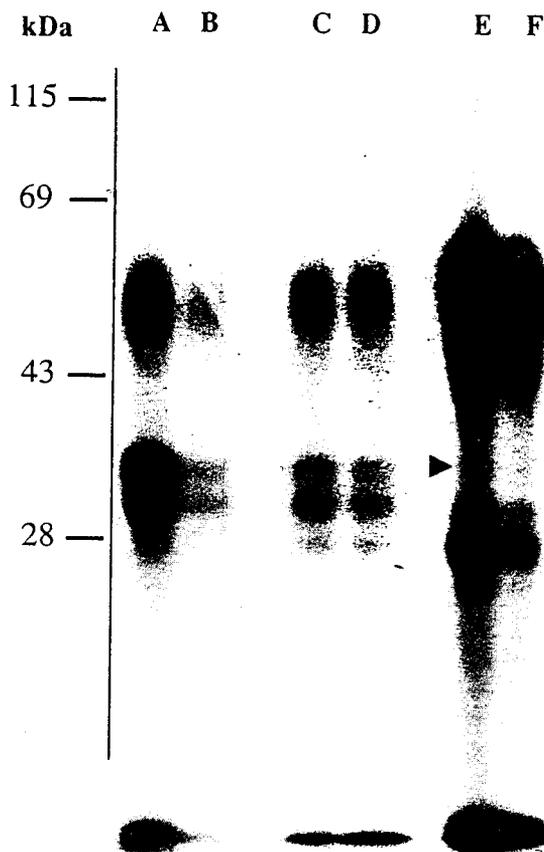


FIG. 4. AUTORADIOGRAPHY OF AN SDS-PAGE CONTAINING  $^{125}\text{I}$ -LABELLED *C. cerastes* VENOM POLYPEPTIDES BOUND TO *T. cruzi* EPIMASTIGOTES AND *L. d. infantum* PROMASTIGOTES. The lanes represent as follows: epimastigotes (A,  $10^7$  parasites; B,  $10^6$  parasites); promastigotes (C,  $10^7$  parasites; D,  $10^6$  parasites). E and F profiles of labelled venom components (E,  $3 \times 10^4$  cpm; F,  $1.5 \times 10^4$  cpm). A faint band of an apparent mol. mass of 40 kDa is indicated by an arrow-head.

significant difference between control cultures and venom-treated parasites;  $P > 0.1$ ,  $P > 0.2$ , at 12 hr and 48 hr of culture, respectively). Moreover, a dose-response inhibition curve of *Leishmania* parasite growth could be obtained when using increasing concentrations of the venoms (Fig. 1.II.B). Heating of venoms at  $95^\circ\text{C}$  for 30 min abolished the inhibitory activity completely (Fig. 2.A and 2.B).

Complementary investigations were done using parasite vertebrate stages (e.g. *T. cruzi* trypomastigote and amastigote forms, and *Leishmania* amastigotes). As shown in Fig. 3, *C. cerastes* venom caused a significant inhibition of the RNA precursor incorporation by *T. cruzi* and *Leishmania amastigotes*, A and B, respectively (significant difference between control cultures and venom-treated parasites:  $P < 5 \times 10^{-2}$  and  $P < 10^{-3}$  for *T. cruzi* and *Leishmania amastigotes*, respectively). A similar inhibitory effect of *C. cerastes* venom could also be seen in the case of *T. cruzi* trypomastigotes (C, significant difference between control cultures and venom treated parasites,  $P < 10^{-3}$ ). Taken together, these results clearly indicate that *C. cerastes* venom impaired nucleic acid synthesis by vertebrate forms of *T. cruzi* and *Leishmania* parasites.

In order to identify the venom factor(s) which could interact with the parasites, we performed complementary experiments where  $^{125}\text{I}$ -labelled venom proteins were incubated during 3 hr with  $10^6$  or  $10^7$  parasites (*T. cruzi* epimastigotes or *L. d. infantum* promastigotes). As shown in Fig. 4, labelled *C. cerastes* venom ( $3 \times 10^4$  to  $1.5 \times 10^4$  cpm, E and F, respectively) contained a large band of mol. mass between 43 and 69 kDa and other components of mol. mass 30, 28, and 26 kDa. A faint band of mol. mass 40 kDa could also be distinguished.

The profiles of *T. cruzi* and *L. d. infantum* bound material are very similar (Fig. 4A, B; and C, D, respectively). Part of the material comprising the largest band (43–69 kDa) could be bound to the parasites. However, the most interesting feature is the fact that two other components of molecular mass 30 and 40 kDa were selectively bound by the parasites. It is interesting to note that the 40 kDa component is concentrated by the parasites despite the fact that it is a minor component of the venom.

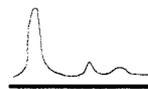
To our knowledge this is the first report showing an inhibitory activity of snake venoms on the growth of *T. cruzi* and *L. d. infantum*. It is also of interest to note that *C. cerastes* is less toxic to humans according to the WHO classification (WHO, 1981). Given the fact that none of the drugs that have reached the stage of clinical trials has been considered safe, convenient or cheap for large-scale application, it is of paramount importance to search for alternative natural compounds that could have social and economic impact in the treatment of Chagas' disease or Leishmaniasis. Further fractionation of *Cerastes* venom would allow the identification of the active molecule(s).

*Acknowledgements*—This work was supported by INSERM U415. RODOLFO FERNANDEZ-GOMEZ is a recipient of a Venezuelan CONICIT-BID fellowship. The authors wish to thank Pr. A. Tartar for providing scorpion and spider venoms.

#### REFERENCES

- ALOOF-HIRSCH, S., DEVRIES, A. and BERGER, A. (1968) The direct lytic factor of cobra venom: purification and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 53–60.
- CORNETTE, J., CAPRON, A. and OUAISSI, M. A. (1988) *Trypanosoma cruzi*: fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* **86**, 139–146.
- CROFT, S. L. (1986) *In vitro* screens in the experimental chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Parasit. Today* **2**, 64–69.
- DE CASTRO, S. L. and MEIRELLES, M. D. Z. (1990) Mechanism of action of a nitroimidazole-Thiadiazole derivate upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **85**, 95–99.
- DE DIEGO, C., AVEDANO, C., ALCINA, A., CARRASCO, L. and ELGUERO, J. (1988) Effect of heterocyclic analogues of triphenylmethane dyes against *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **82**, 235–241.
- DO CAMPO, R., MORENO, S. N. J., GADELHA, F. R., DE SOUZA, W. and CRUZ, F. S. (1988) Prevention of Chagas' disease resulting from blood transfusion by treatment of blood: toxicity and mode of action of gentian violet. *Biomed. Environm. Sci.* **1**, 406–413.
- GUEVARA, P., RAMIREZ, J. L., ROJAS, E., SCORZA, J. V., GONZALEZ, N. and ANEZ, N. (1993) *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. *Lancet* **341**, 1341.
- GUTTERIDGE, W. E. (1987) New anti-protozoal agents. *Int. J. Parasit.* **17**, 121–129.
- MENEZ, A. (1993) Les structures des toxines des animaux venimeux. *Pour Sci.* **190**, 34–40.
- MODABBER, F. (1993) Chagas' disease. In: *Tropical Disease Research, Ninth Programme Report of the UNDP/World Bank/WHO*. Geneva: World Health Organization.
- MONCAYO, A. (1993) Chagas' disease. In: *Tropical Disease Research, Ninth Programme Report of the UNDP/World Bank/WHO*. Geneva: World Health Organization.
- MORELLO, A. (1988) The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxification mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* **90C**, 1–12.
- OUAISSI, A., CORNETTE, J., SCHONECK, R., PLUMAS-MARTY, B., TAIBI, A., LOYENS, M. and CAPRON, A. (1992) Fibronectin cleavage fragments provide a growth factor-like activity for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Eur. J. Cell. Biol.* **59**, 68–79.

- OUAISSI, A., CORNETTE, J. and CAPRON, A. (1986) Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasit.* **19**, 201–211.
- OUELLETTE, M. and PAPADOPOULOU, B. (1993) Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasit. Today* **9**, 150–153.
- PINTO DIAS, J. C. and BRENER, Z. (1984) Chagas' disease and blood transfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **79**, 139–143.
- RIZVI, F. S., AFCHAIN, D., SHERLOCK, L., SADIGURSKY, M., CAPRON, A. and SANTORO, F. (1985) Infectivity of *Leishmania* promastigotes is associated with surface antigenic expression. *Immun. Lett.* **11**, 317–323.
- SKARNES, R. C. (1970) L-aminoacid oxidase, a bactericidal system. *Nature* **225**, 1072–1073.
- STILES, B. G., SEXTON, F. W. and WEINSTEIN, S. A. (1991) Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon* **29**, 1129–1141.
- ZERROUK, H., BOUGIS, P. E., CEARD, B., BENSLIMANE, A. and MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. (1991) Analysis by high performance liquid chromatography of *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (black scorpion) venom. *Toxicon* **29**, 951–960.
- ZILBERSTEIN, D. and DWYER, D. M. (1984) Antidepressants cause lethal disruption of membrane function in the human protozoan parasite *Leishmania*. *Science* **226**, 977–979.
- ZUCKEMAN, A. and LAINSON, R. (1977) *Leishmania*. New York: Academic Press.
- WHO (1981) Caractérisation des venins et standardisation des sérums antivenimeux: progrès réalisés. *WHO Offset Pub.* **58**, 22–23.



## 2. Purification des substances actives contre *Trypanosoma cruzi* présentes dans le venin de *Cerastes cerastes*

La séparation des protéines du venin de *C. cerastes* a pour but l'isolement de molécules actives contre le parasite. Celle-ci est réalisée en plusieurs étapes en fonction de la taille et de la charge des protéines. Après chaque séparation, un test de toxicité vis-à-vis des formes épimastigotes est effectué. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Rholam de l'Université Pierre et Marie Curie (URA 1662 CNRS).

### a) Matériels et Méthodes

#### (1) Venins

Le venin de vipère à corne, *Cerastes cerastes*, utilisé provient du laboratoire du Service de Biochimie, de l'Institut Pasteur de Casablanca (Maroc). Ce venin, fourni sous forme cristallisée, a été remis en suspension dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) à pH 7,4.

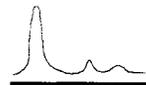
#### (2) Parasites

##### (a) Souches

Les souches de *T. cruzi* employées dans ce travail sont les suivantes:

♦ La souche Y a une affinité pour les cellules du système réticulo-endothélial (Silva et Nussenzeig, 1953).

♦ Les souches TEH (Téhuantepec) et CL. Elles ont une affinité pour les cellules musculaires (Darman et al., 1941; Brener et al., 1976).



### *(b) Culture de parasites*

Les formes épimastigotes sont mises en culture pendant 4 jours à 28°C dans un milieu de Glucose-Lactalbumine-Sérum-Hémoglobine (GLSH) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (Cornette, 1988).

### *(c) Test d'activité trypanocide*

Après culture, les parasites sont lavés dans du milieu GLSH frais et aliquotés à raison de  $10^6$  parasites/ml, puis transférés dans des plaques de microtitration (96 puits) en présence de venin ou de fractions purifiées du venin, dans un volume total de 200 $\mu$ l. Ensuite, 0,5 $\mu$ Ci de thymidine  $^3\text{H}$  sont additionnés dans chaque puits. Un control est réalisé dans les mêmes conditions en absence de venin ou de fractions purifiées.

Après 24 heures d'incubation, les parasites sont lavés puis filtrés. Les disques de papier filtre sont séchés et comptés au compteur à scintillation. Les tests sont réalisés en triplicata et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la prolifération parasitaire, calculés selon la formule ci-dessous:

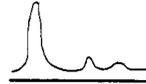
$$[(\text{cpm parasites non-traités} - \text{cpm parasites traités}) / \text{cpm parasites non-traités}] \times 100$$

## **(3) Séparation des protéines**

### *(a) Chromatographie liquide à basse pression (Sephadex G-75)*

Les tamis moléculaires permettent de séparer les protéines en fonction de leur taille. Les protéines ayant un poids moléculaire élevé seront éluées les premières.

La séparation par chromatographie liquide à basse pression (Low



Pressure Liquid Chromatography, LPLC) est réalisée sur une colonne XK16 2x100, par tamisage moléculaire sur un gel Sephadex G-75 superfine. La colonne est équilibrée par du tampon PBS (pH 7,4).

(b) *Chromatographie liquide à moyenne pression*

Le tamisage moléculaire ne constitue qu'une étape de purification préalable, il convient ensuite de fractionner les protéines en fonction de leur charge.

(i) Colonne Mono S

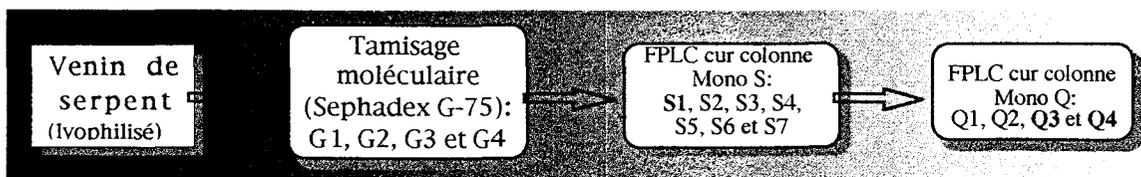
La colonne Mono S (Pharmacia Biotech) possède un groupe sulfonique chargé négativement à un pH variant de 2 à 12. Cette caractéristique fait de la colonne un échangeur fort de cations.

La colonne est équilibrée par du sulfate de sodium 0,1M à pH 6,2. L'élution est réalisée avec un gradient de NaCl de 0 à 1M.

(ii) Colonne Mono Q

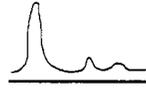
Cette colonne (Pharmacia Biotech) est un échangeur fort d'anions qui lie les biomolécules chargées négativement. Cet échangeur d'anions se maintient chargé positivement à un pH compris entre 2 et 12.

La colonne mono Q est équilibrée dans un tampon Tris 25mM à pH 7. L'élution est réalisée avec un gradient de NaCl de 0 à 1M.



(c) *Dosage des protéines*

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry modifiée par Marckwell et al. (1978).



### b) Résultats

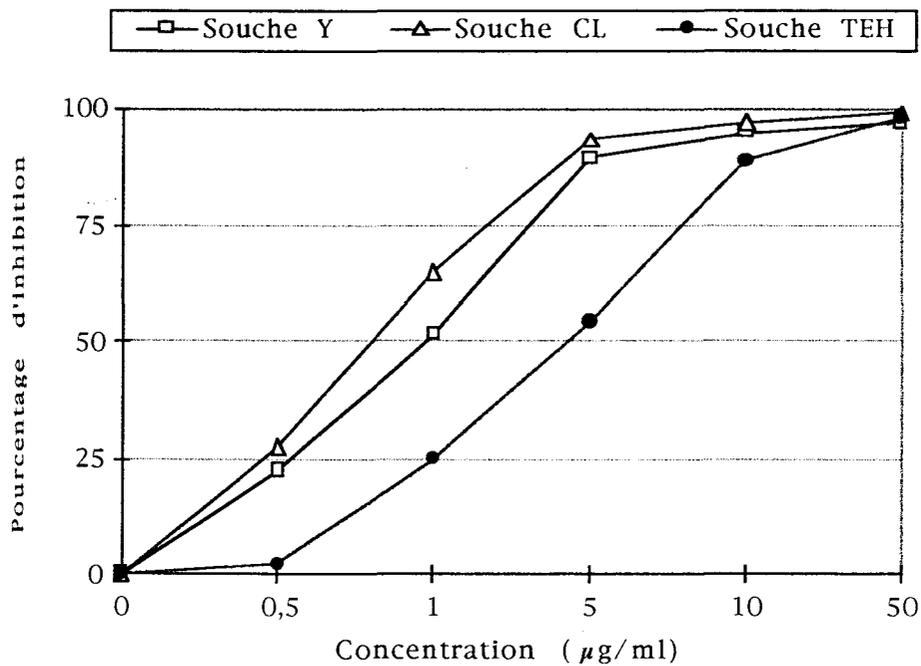
La première étape de chromatographie nous a permis de purifier plusieurs fractions du venin de *C. cerastes*. Celles-ci ont été testées pour leur activité trypanocide dans un système *in vitro* d'incorporation de thymidine  $^3\text{H}$  par les formes épimastigotes de 3 souches de *T. cruzi*. Parmi les composants testés, la fraction G1 a été sélectionnée pour son fort pouvoir inhibiteur sur la multiplication des parasites (95-97 %) à une concentration de 10  $\mu\text{g/ml}$  (Tableau 2).

| Fractions | Souche Y | Souche CL | Souche TEH |
|-----------|----------|-----------|------------|
| Cc        | 95,0     | 96,9      | 93,0       |
| G1        | 95,8     | 97,0      | 96,9       |
| G2        | 47,8     | 19,2      | 21,9       |
| G3        | 1,0      | 1,5       | 1,5        |
| G4        | 12,0     | 15,0      | 11,0       |
| G5        | 9,0      | 10,0      | 8,0        |

Tableau 2: Pourcentage d'inhibition de la prolifération de 3 souches de *T. cruzi* en présence des différentes fractions purifiées du venin.



L'effet trypanocide obtenu avec la fraction G1 est dose dépendant avec une concentration d'inhibition de la prolifération de 50% (CI 50) pour une concentration inférieure ou égale à 1  $\mu\text{g/ml}$  pour les souches Y et CL, et une concentration inférieure à 5  $\mu\text{g/ml}$  pour la souche TEH (Graphique suivant).

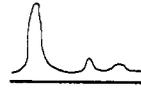




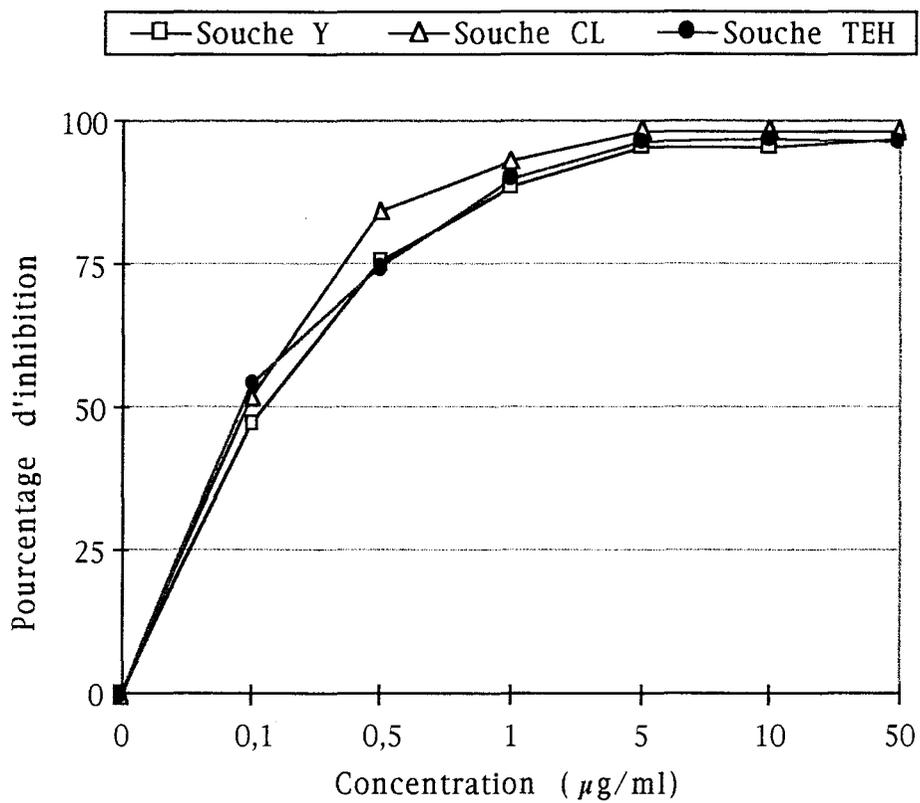
Dans un deuxième temps, la fraction G1 a été passée sur une colonne Mono S en chromatographie liquide à moyenne pression (FLPC). Parmi les composés obtenus, la fraction S1 a été retenue car elle inhibe entre 96 et 98 % la multiplication des parasites à une concentration de 5 µg/ml (Tableau 3).

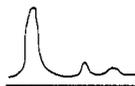
| Fractions | Souche Y | Souche CL | Souche TEH |
|-----------|----------|-----------|------------|
| Cc        | 94,9     | 98,6      | 97,4       |
| G1        | 97,1     | 98,8      | 97,8       |
| S1        | 96,6     | 98,7      | 98,7       |
| S2        | 60,0     | 55,0      | 49,0       |
| S3        | 8,7      | 37,9      | 10,6       |
| S4        | 25,9     | 45,6      | 30,2       |
| S5        | 27,6     | 31,4      | 21,6       |
| S6        | 0,5      | 0,5       | 0,4        |
| S7        | 0,6      | 0,4       | 0,6        |

Tableau 3: Pourcentage d'inhibition de la prolifération de 3 souches de *T. cruzi* en présence des fractions issues de la deuxième étape de purification du venin.



Les différentes concentrations de la fraction S1 testées, montrent un effet dose-dépendant et une CI 50 < 0,1  $\mu\text{g/ml}$  sur les 3 souches de *T. cruzi* (Graphique ci-dessous).





Nous avons poursuivi la purification de la fraction S1 par une colonne d'échange d'ion Mono Q en FLPC, et nous avons isolé 4 fractions (Q1 à Q4). Les tests révèlent une activité trypanocide de 82 à 97 % pour les fractions Q3 et Q4 (Tableau 4).

| Fractions | Souche Y | Souche CL | Souche TEH |
|-----------|----------|-----------|------------|
| Cc        | 70,3     | 71,5      | 70,9       |
| G1        | 71,2     | 76,9      | 74,3       |
| S1        | 97,0     | 97,3      | 91,2       |
| Q1        | 49,2     | 45,7      | 44,4       |
| Q2        | 28,0     | 29,3      | 24,3       |
| Q3        | 82,2     | 92,6      | 90,2       |
| Q4        | 90,7     | 96,1      | 85,2       |

Tableau 4: Pourcentage d'inhibition de la prolifération de 3 souches de *T. cruzi* en présence des fractions issues de la troisième étape de purification du venin.

Notre étude des composants du venin se poursuit actuellement par la purification sur une colonne hydrophobe des fractions Q3 et Q4.



## B. Substances chimiques

### 1. Article 2



International Journal of Antimicrobial Agents 6 (1995) 111-11

INTERNATIONAL JOURNAL OF  
Antimicrobial  
Agents

#### 2-Amino diphenylsulfides as new inhibitor of trypanothion reductase

Rodolfo Fernandez-Gomez<sup>b</sup>, Mirelle Moutiez<sup>a</sup>, Marc Aumercier<sup>a</sup>, Gilles Bethegnies<sup>c</sup>,  
Michel Luyckx<sup>c</sup>, Ali Ouaissi<sup>b</sup>, André Tartar<sup>a</sup>, Christian Sergheraert<sup>a</sup>, \*

<sup>a</sup>Service de Chimie des Biomolécules. URACNRS 1309, Institut Pasteur, Faculté de Pharmacie, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomatidae, Unité INSERM U 415, Institut Pasteur, Faculté de Pharmacie, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, France

<sup>c</sup>Laboratoires de Pharmacie Clinique et de Chimie Organique, Faculté de Pharmacie, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, France



Des travaux antérieurs ont établis que des composés de type phénothiazine ont une activité trypanocide sur différents membres de la famille des Trypanosomatidés; malheureusement ces composés ont également une activité neuroleptique (Elias et Boyer, 1979; Pearson et al., 1982; Seebeck et Gehr, 1983; Zilberstein et Dwyer, 1984; Doyle et Weinbach, 1989; Benson et al., 1992; de Castro et al., 1992; Gruska et al., 1993). Une modification de structure, selon la théorie de Dodd, par ouverture du noyau central de la phénothiazine (amino-2-diphényl sulfure) entraîne une diminution des effets neuroleptiques (Baert, 1975).

Le criblage d'une pharmacothèque classique a été réalisé par le groupe du Dr. Sergheraert, dirigé par le Pr Tartar, grâce à un test enzymatique permettant d'évaluer l'inhibition de la trypanothion réductase (TR). Ce criblage a permis d'établir que la structure de l'amino-2-diphényl sulfure peut constituer une nouvelle "tête de série" comme inhibiteur potentiel de la TR.

Nous avons étudié l'effet trypanocide de ces amino-2-diphényl sulfures.

**Les résultats obtenus sont les suivants :**

- ♦ En comparant l'activité des analogues d'amino-2-diphényl à celle de l'inhibiteur de référence de la TR, la clomipramine ( $K_i = 12 \mu\text{M}$ ), nous avons établi que le composé **1a** a une activité inhibitrice de la TR proche de celle de la clomipramine ( $K_i = 27 \mu\text{M}$ ).
- ♦ Ce composé **1a** se révèle inhibiteur compétitif de la TR, enzyme spécifique de la famille des Trypanosomatidés, alors qu'il est inactif sur la Glutathion réductase, l'analogue chez les mammifères. Nous possédons donc une molécule active sur l'enzyme du parasite tout en



étant inactive sur celle de l'hôte.

♦ L'inhibition de l'activité de la TR par le composé **1a** a été corrélée à l'effet trypanocide. Nous avons montré une activité trypanocide du composé **1a** à 27  $\mu\text{M}$ , tandis que le Benznidazole et le Nifurtimox n'ont qu'une activité trypanostatique à 380  $\mu\text{M}$ .

♦ L'étude comparative de l'incorporation d'uridine  $^3\text{H}$  aux différents stades du cycle parasitaire chez le vertébré, trypomastigotes et amastigotes, met en évidence l'action du composé **1a** sur les précurseurs des ARNs.

En conclusion, ces observations laissent envisager une utilisation potentielle de l'amino-2-diphényl sulfure comme anti-chagasique.

## 2-Amino diphenylsulfides as new inhibitors of trypanothione reductase

Rodolfo Fernandez-Gomez<sup>b</sup>, Mireille Moutiez<sup>a</sup>, Marc Aumercier<sup>a</sup>, Gilles Bethegnies<sup>c</sup>,  
Michel Luyckx<sup>c</sup>, Ali Ouaisi<sup>a,b</sup>, André Tartar<sup>a</sup>, Christian Sergheraert<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Service de Chimie des Biomolécules, URA CNRS 1309, Institut Pasteur, Faculté de Pharmacie, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Recherche sur les Trypanosomatidae, Unité INSERM U 415, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, France

<sup>c</sup>Laboratoires de Pharmacie Clinique et de Chimie Organique, Faculté de Pharmacie, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille, France

Accepted 22 July 1995

### Abstract

Trypanothione reductase (TR) is the primary enzyme responsible for the reduction of trypanothione, the analog of glutathione found in trypanosomatidae. We have discovered a series of diphenylsulfides which are potent inhibitors of TR and have no activity on mammalian glutathione reductase. These compounds are also active in vitro on various stages of the parasite. Although structurally related to phenothiazines, which are known to be TR inhibitors, these compounds are devoided of any neuroleptic activity, making them attractive leads to develop specific and non toxic anti-chagasic drugs.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*; Trypanosomatidae; Trypanothione reductase; 2-Amino-diphenylsulfide; Enzyme inhibitors

### 1. Introduction

Chagas' disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is a major health problem in South and Central America. Actually, two nitroheterocycles: nifurtimox (3-methyl-4-(5'-nitrofurfurylideneamino) tetrahydro-4H-1,4thiazine-1,1-dioxyde) and benznidazole (N-benzyl-2-nitroimidazole acetamide) are used to cure the disease. They eliminate acute phase symptoms, shortening the course of infection but their efficiency in the treatment of chronic patients is controversed. Due to their lack of specificity, both derivatives are responsible for serious side-effects, a major drawback since a large number of doses must be administrated for long periods of time [1–6]. The need for more rationally designed molecules has led to the search for significant distinctions between the metabolic pathways of the host and its parasite [7]. A major breakthrough occurred with the discovery by Fairlamb et al. that the mammalian redox defense system based on glutathione and the associated enzyme, glutathione reductase (GR) is replaced in try-

panosomes by an analogous system in which glutathione is replaced by a spermidine conjugate named trypanothione (N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(glutathionyl) spermidine, T(S)<sub>2</sub> which is maintained in its reduced dithiol form, T(SH)<sub>2</sub>, by trypanothione reductase (TR) [8]. Despite 41% homology in their primary structure, human GR and *T. cruzi* TR show almost total mutual discrimination toward their respective substrates. Therefore it seems possible to design selective TR inhibitors likely to compromise the natural defenses of the parasite [9]. As part of a random screening effort to identify novel compounds capable of inhibiting TR [10], we have discovered a series of 2-amino-diphenylsulfide derivatives which are specific inhibitors of TR and devoided of any activity on GR. These compounds are active in vitro against epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi*.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Materials

Biochemicals and their sources were: glutathione (Janssen); NADPH (Bohringer); trypanothione (Bachem); bovine intestinal mucosa glutathione reduc-

\*Corresponding author. Tel. (+33) 20 87 77 74; Fax (+33) 20 87 78 88.

tase (Sigma); recombinant trypanothione reductase was obtained from the SG5 *E. coli* strain with the overproducing expression vector pIBIT cz TR (gift from Dr. C. Walsh and K. Nadeau, Harvard Medical School) and was purified as previously described [11]. Chemicals were purchased from Janssen. Melting points were determined on a melting point Büchi apparatus and were uncorrected. All reactions were monitored by thin layer chromatography (acetone/ $\text{NH}_4\text{OH}$  28%, 9/1) or ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ , 9/1) carried out on 0.2 mm E. Merck silica gel plates (60F-254) using UV light as visualizing agent and 10% ninhydrin in acetone or Reindel Höpfe (R.H.) as developing agents. Purity of final compounds was checked by HPLC (Nucleosil cyanopropyl) before preparing oxalate salts.  $^1\text{H}$  spectra were obtained using a Bruker 300 MHz spectrometer; mass spectra were recorded on a time of flight plasma desorption spectrometer using a Californium source. Microanalyses for all compounds (or their oxalate salts) were obtained from CNRS (France); they were indicated by the symbols of the elements and were always within 0.4% of theoretical values.

## 2.2. Chemistry

The different steps are presented in Fig. 1.

*General procedure for the preparation of 4 or 4'-chloro-2-nitro-diphenylsulfides.* To a solution of the appropriate thiophenol (0.1 mole) in absolute ethanol (20 mL), at  $0^\circ\text{C}$ , were slowly added some lumps of sodium (2.3 g, 0.1 mole). After dissolution of the sodium, a solution of the appropriate 2-nitro-chlorobenzene (0.1 mole) in absolute ethanol (80 mL) was added and the mixture was refluxed for 30 min. NaCl was then eliminated by filtration and the nitro derivative was precipitated by addition of water. It was recrystallized from ethanol (150 mL), yield: 85%.

*General procedure for the preparation of 2-amino-4 or 4'-chloro-diphenylsulfides.* In the presence of Raney nickel, at  $80^\circ\text{C}$ , for 5 h the nitro derivative was reduced by hydrogen under pressure (100 bars). The corresponding amino derivative was recrystallized from petroleum ether, yield: 75%.

*General procedure for the preparation of 4 or 4'-chloro-2-(3-chloro)acetyl or propionylamido diphenylsulfides.* To an ice-cooled solution of 2-amino-4 or 4'-chlorodiphenylsulfide (2.5 g, 10.6 mmol) in ether (44 mL) and pyridine (1.7 mL) was added dropwise either chloroacetyl or chloropropionyl chloride (12.7 mmol). The reaction mixture was allowed to reach room temperature and was successively washed with aqueous NaCl (saturated solution), 1 M HCl and 2.5 M NaOH. The organic solution was then separated, dried and evaporated to yield quan-

titatively the corresponding chloro acetyl or propionylamides.

*General procedure for the substitution of 4 or 4'-chloro-2-(3-chloro)acetyl or propionylamido diphenylsulfides by secondary amines.* A solution of the chloro acetyl or propionylamide derivative (8.5 mmol), triethylamine (8.5 mmol) and secondary amine (dimethylamine, pyrrolidine or N-methyl piperazine, 9.4 mmol) in benzene (40 mL) was refluxed for 16 h. The organic phase was washed with water then 1 M HCl. The aqueous phase was then alcalinized and extracted with ether. The ethered phase was dried and evaporated to dryness to yield quantitatively the corresponding amines.

*General procedure for the reduction of the amidodiphenylsulfides into amines: compounds 1a-c, 2a-c and 3a-c.*

To a solution of dimethylamino, pyrrolidino or piperazinoamide (75 mmol) in THF (10 mL), was slowly added  $\text{LiAlH}_4$  (375 mmol) and the mixture was refluxed for 2 h. After cooling, water was added dropwise to eliminate the excess of  $\text{LiAlH}_4$ . The organic phase was dried and evaporated to dryness. Amines 1a-c, 2a-c and 3a-c were isolated as oxalate salts according to the following procedure: to a saturated solution of amine in ethyl acetate was added dropwise a saturated solution of oxalic acid in ethyl acetate and the mixture was kept at  $4^\circ\text{C}$  for 3 h. Oxalates were isolated by filtration and successively washed with ice cold ethyl acetate and ether. All data concerning purity of the tested compounds are given in Table 1.

## 2.3. Assays of TR and GR activity

TR activity was measured at  $28^\circ\text{C}$  in a 0.02 M Hepes buffer, pH 7.25 containing 0.15 M KCl, 1 mM EDTA and 0.2 mM NADPH with an enzyme concentration of  $0.02 \text{ U ml}^{-1}$ . The reaction was started by addition of the enzyme and the absorbance decrease was followed at 340 nm. Kinetic constants were determined either according to Lineweaver-Burk with four different inhibitor concentrations or in Dixon plots with four different substrate concentrations.

Inhibitory potencies of the compounds were also tested toward bovine intestinal mucosa GR in the same conditions as TR assays.

## 2.4. Neuroleptic activity

Fresh rat striatum was homogenized with an ultraturax homogenizer in 40 volumes of ice-cold buffer I (50 mM Tris-HCl, pH 7.7 at  $20^\circ\text{C}$ ) for 10 s, three times successively. Homogenate was centrifuged at 35 000 g and  $4^\circ\text{C}$  for 10 min (Centrifuge L8-55M Beckman Rotor 50T). Pellet was resuspended two times in the same buffer and centrifuged at 35 000 g for 10 min. The final

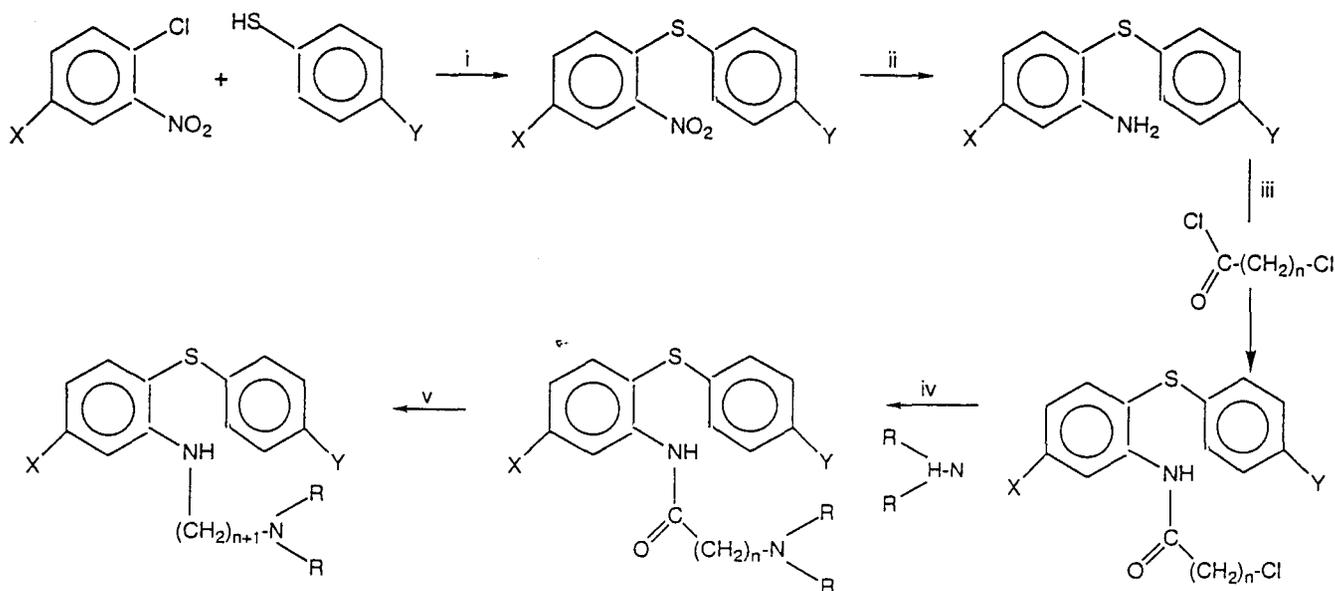


Fig. 1. Preparation of 2-amino-diphenylsulfides 1a–c, 2a–c and 3a–c: 1a–c, X = Cl, Y = H,  $n = 2$ ; 2a–c, X = Cl, Y = H,  $n = 1$ ; 3a–c, X = H, Y = Cl,  $n = 1$ . Reagents and conditions: (i): Na, ethanol, 2 h reflux; (ii): H<sub>2</sub>, 100 bars, Raney Ni, 5 h; (iii): ether-pyridine, 0°C; (iv): triethylamine, NH(R)<sub>2</sub>, benzene, 16 h reflux; (v): LiAlH<sub>4</sub>, 5 eq., THF, 2 h reflux.

pellet was resuspended in 200 volumes of buffer II containing 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% ascorbic acid and 0.01 mM pargyline (IMAO), pH 7.6 at 20°C. The incubation mixture consisted of 100 mL of <sup>3</sup>H spiperone (20 Ci/mmol, 0.4 nM final concentration), 100 mL of the compound solution and 800 mL of freshly prepared tissue suspension in a total volume of 1 mL. The samples were incubated in triplicate for ten minutes at 37°C and then immediately filtered under reduced pressure. Radioactivity of the GFC filtrate was determined using 5 mL of liquid scintillation (Ready

Protein Beckman). All the steps were carried out in the dark at 4°C.

### 2.5. Parasites

The Y strain of *T. cruzi* was used throughout the study. Trypomastigotes were obtained in tissue culture by weekly infection of 3T3 fibroblasts as described elsewhere [12]. The amastigotes forms were obtained by differential centrifugation on metrizamide gradient [13]. *T. cruzi* epimastigotes were cultured at 28°C in glucose-

Table 1  
Physico-chemical characteristics of compounds 1a–c, 2a–c and 3a–c

| Compound | MP (°C) | Anal C, H, N, S, Cl   | Mol. weight | NMR: $\delta$ (ppm, CDCl <sub>3</sub> )   |
|----------|---------|---|-------------|---|
| 1a       | 218     | C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> SCl | 556         | 7.45–7 (7H, aniline + phenyl); 6.60 (d, 1H, H <sub>a</sub> ); 5.35 (s, 1H, NH); 3.15 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2.40–2.15 (13H, CH <sub>2</sub> + CH <sub>3</sub> ); 1.70 (m, 2H, CH <sub>2</sub> )   |
| 1b       | 153     | C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> SCl | 437         | 7.45–7 (7H, aniline + phenyl); 6.60 (d, 1H, H <sub>a</sub> ); 5.35 (s, 1H, NH); 3.15 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2.40–2.15 (6H, CH <sub>2</sub> ); 1.70 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 1.60 (m, 4H, CH <sub>2</sub> )  |
| 1c       | 150     | C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> SCl | 411         | 7.45–7 (7H, aniline + phenyl); 6.60 (d, 1H, H <sub>a</sub> ); 5.35 (s, 1H, NH); 3.15 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2.40–2.15 (8H, CH <sub>2</sub> ); 1.70 (m, 2H, CH <sub>2</sub> )  |
| 2a       | 216     | C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> SCl | 542         | 7.45–7 (7H, aniline + phenyl); 6.60 (d, 1H, H <sub>a</sub> ); 5.35 (s, 1H, NH); 3.15 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2.40–2.15 (13H, CH <sub>2</sub> )   |
| 2b       | 195     | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> SCl | 423         | 7.45–7 (7H, aniline + phenyl); 6.60 (d, 1H, H <sub>a</sub> ); 5.35 (s, 1H, NH); 3.15 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2.40–2.15 (6H, CH <sub>2</sub> ); 1.60 (m, 4H, CH <sub>2</sub> )  |
| 2c       | 165     | C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> SCl | 397         | 7.45–7 (7H, aniline + phenyl); 6.60 (d, 1H, H <sub>a</sub> ); 5.35 (s, 1H, NH); 3.15 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2.40–2.15 (7H, CH <sub>2</sub> )  |
| 3a       | 215     | C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> SCl | 542         | 7.40 (1H, H <sub>a</sub> ); 7.30 (1H, H <sub>a</sub> ); 7.15 (2H, Cl meta); 6.95 (2H, Cl ortho); 6.75–6.70 (2H, H <sub>3-5</sub> ); 5.35 (s, 1H, NH); 3.15 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2.40–2.15 (13H, CH <sub>2</sub> ); 1.70 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ) |
| 3b       | 163     | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> SCl | 423         | 7.40 (1H, H <sub>a</sub> ); 7.30 (1H, H <sub>a</sub> ); 7.15 (2H, Cl meta); 6.95 (2H, Cl ortho); 6.75–6.70 (2H, H <sub>3-5</sub> ); 5.35 (s, 1H, NH); 3.15 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2.40–2.15 (6H, CH <sub>2</sub> ); 1.60 (m, 4H, CH <sub>2</sub> )  |
| 3c       | 153     | C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> SCl | 397         | 7.40 (1H, H <sub>a</sub> ); 7.30 (1H, H <sub>a</sub> ); 7.15 (2H, Cl meta); 6.95 (2H, Cl ortho); 6.75–6.70 (2H, H <sub>3-5</sub> ); 5.35 (s, 1H, NH); 3.15 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 2.40–2.15 (8H, CH <sub>2</sub> )                                  |

lactalbumin serum-haemoglobin medium (GLSH) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (HFCS) and antibiotic [14].

### 2.6. Parasite *in vitro* assay for drug activity

Epimastigotes forms were washed and aliquots ( $5 \times 10^5$ ) were transferred to 96-well microplates with the drug in a total volume of 200  $\mu$ l and pulsed with  $^3\text{H}$ -thymidine (0.5  $\mu$ l was added to give 0.5  $\mu\text{Ci}/\text{well}$ ). In the case of amastigotes and trypomastigotes forms, the cultures were collected and washed in RPMI 1640 containing 5% HFCS, then they were aliquoted ( $5 \times 10^6$ ) and pulsed with  $^3\text{H}$ -uridine (0.5  $\mu$ l was added to give 0.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ). Control cultures consisted of parasites incubated in the presence of culture medium alone. After different incubation times, parasites were harvested in an automated sample harvester. The filter discs were dried, placed in scintillation fluid and counted in a scintillation counter. Results are expressed as the radioactivity incorporated. All cultures were set up in triplicate. The results were compared with the Student's *t*-test as described elsewhere [15].

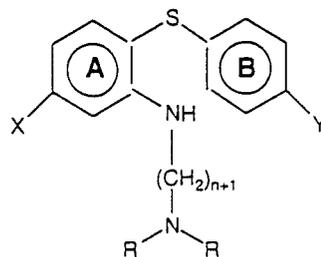
### 3. Chemistry

The substituted 2-amino-diphenylsulfides given in Fig. 2 were prepared by the general method shown in Fig. 1 and described in Material and Methods [16]. Condensation of the appropriate thiophenol and 2-nitro-chlorobenzene gave the 2-nitro-diphenylsulfide which upon catalytic reduction of the nitro group afforded the 2-amino-diphenylsulfide. Acylation of the amino group with either 2-chloro-acetyl chloride or 3-chloro-propionyl chloride followed by condensation with various amines and reduction of the resulting amide group by  $\text{LiAlH}_4$  afforded compounds 1a-c, 2a-c and 3a-c.

### 4. Results

#### 4.1 *In vitro* TR inhibition

The inhibiting capacity of the various compounds submitted to the screening was measured by their ability to inhibit the TR mediated disappearance of NADPH measured at 340 nm ( $K_i$  determination for 1a is given as an example in Fig. 3). Simultaneously, the inhibiting activity of the selected compounds on GR isolated from bovine intestinal mucosa was tested in order to establish their specificity. This allowed to discover a series of 2-amino-diphenylsulfides shown in Fig. 2 [16]. Although the inhibiting capacity of these compounds remain in the micromolar range, the most active 1a, is comparable with clomipramine, the most potent TR inhibitor



|              | X  | Y  | n | R-N-R | $K_i(\mu\text{M})$ |
|--------------|----|----|---|-------|--------------------|
| 1a           | Cl | H  | 2 |       | 27±2               |
| 1b           | Cl | H  | 2 |       | 44±6               |
| 1c           | Cl | H  | 2 |       | 66±6               |
| 2a           | Cl | H  | 1 |       | 46±4               |
| 2b           | Cl | H  | 1 |       | 86±6               |
| 2c           | Cl | H  | 1 |       | 90±10              |
| 3a           | H  | Cl | 1 |       | 80±10              |
| 3b           | H  | Cl | 1 |       | 160±20             |
| 3c           | H  | Cl | 1 |       | 280±30             |
| Clomipramine |    |    |   |       | 12±1               |

Fig. 2. Structures and measured  $K_i$ -values of compounds 1a-c, 2a-c and 3a-c.

reported to date [17]. None of these compounds was active on GR.

The general structure of these diphenylsulfide derivatives offers an attractive lead since it possesses several sites with potential for structural modifications. Even with the limited number of derivatives available in this study, several structure-activity relationships for the inhibition of TR could be established:

The presence of a chlorine substituent is more efficient on cycle A than on cycle B as shown by the higher activity of compounds 2a-2c compared to compounds 3a-c.

A spacer consisting in 3 methylene located between the two amino groups is better than 2 methylene as shown by the higher activity of compounds 1a-c compared to compounds 2a-c.

The nature of the amino group N-(R)-R also plays a role, in all cases, the bulkier substituents being endowed of the higher inhibiting capacity: N-methyl-piperazine > pyrrolidine > dimethylamine.

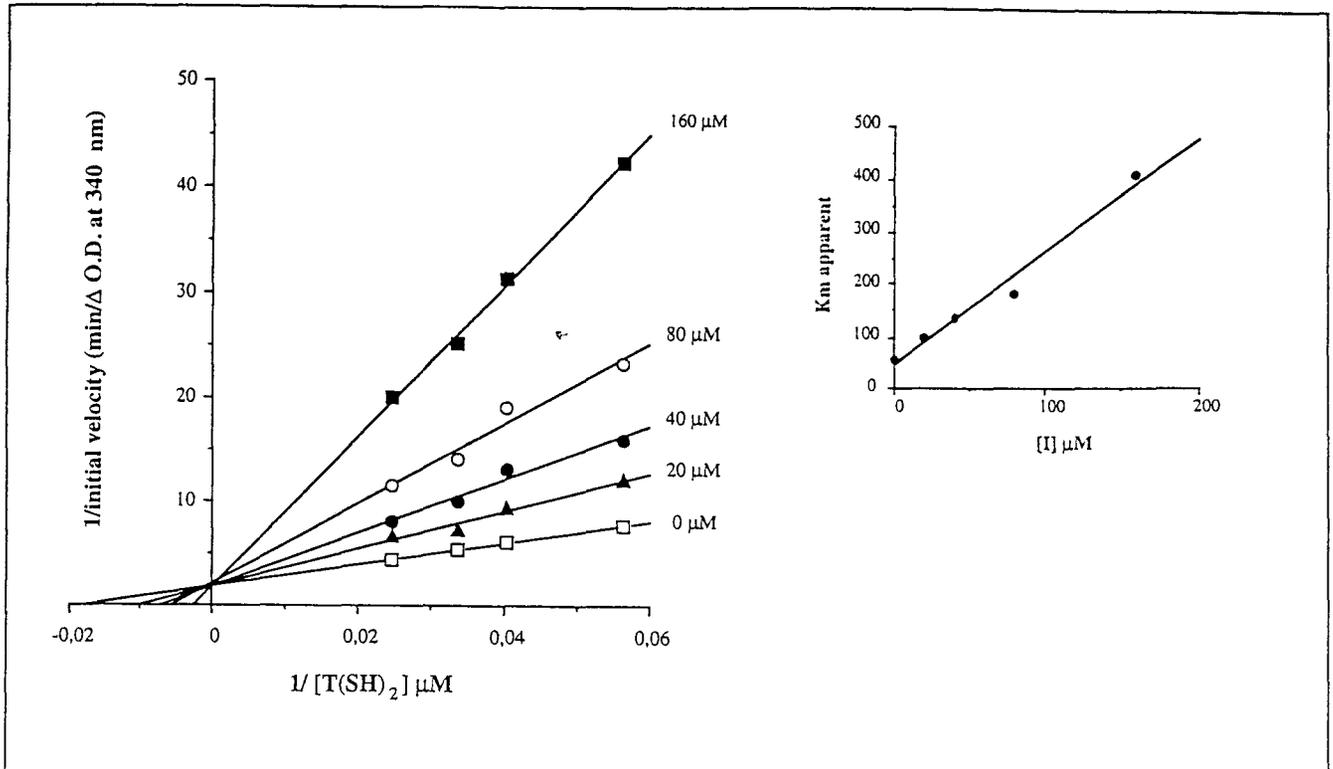


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot for the inhibition of TR from *T. cruzi* by compound 1a.

#### 4.2. In vitro effect on *T. cruzi*

Considering the fact that these compounds exhibit a tenfold range of inhibiting capacity from 27  $\mu\text{M}$  for 1a to 280  $\mu\text{M}$  for 3c, we were interested to test whether such differences were correlated with their effect on the parasite. Three compounds 1a ( $K_i = 27 \mu\text{M}$ ), 2b ( $K_i = 86 \mu\text{M}$ ) and 3c ( $K_i = 280 \mu\text{M}$ ) were selected in order to cover the maximum range of TR inhibiting capacity. They were tested for their capacity to inhibit *T. cruzi* epimastigotes proliferation in an axenic medium, as determined by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation. In these experiments, benznidazole at a concentration of 380  $\mu\text{M}$  was used as a reference. Fig. 4 shows the inhibitory effect of the three compounds at 10  $\mu\text{M}$ : 1a, the most active inhibitor of TR displays an effect comparable with benznidazole at 380  $\mu\text{M}$  while 2b and 3c which are less potent inhibitors are also less active towards the parasite. This was confirmed in Fig. 5 when increasing doses of 1a and 3c were tested, 1a is significantly more active than 3c.

In order to determine whether the observed effect was due to a trypanostatic or to a trypanocidal activity, parasites were incubated for 12 hours with either 1a (27  $\mu\text{M}$ ) or benznidazole or nifurtimox (380  $\mu\text{M}$ ). Viable epimastigotes were counted at 3 h intervals during 12 h. As can be seen from Fig. 6, in the presence of 1a, the number of parasites decreases sharply and after 12 h, no surviving parasite can be detected. By contrary, neither nifurti-

nox nor benznidazole were able to achieve a similar effect, being only endowed with a cytostatic effect.

The study of the activity of 1a against the vertebrate forms of *T. cruzi* (e.g. amastigotes and trypomastigotes)

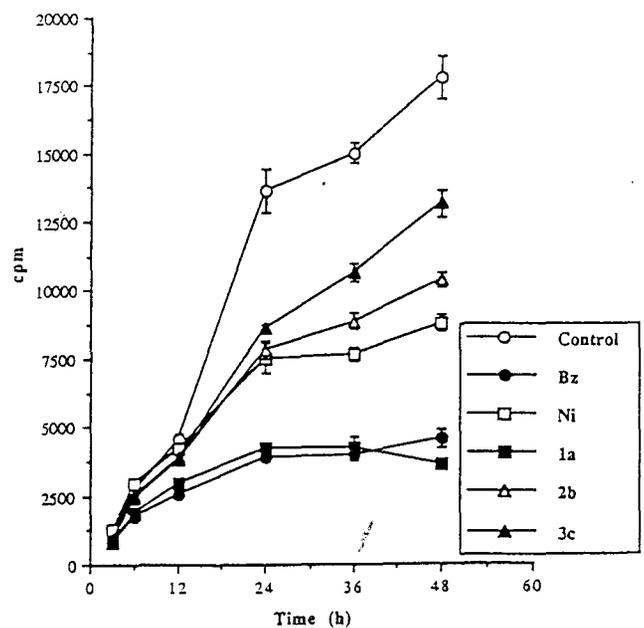


Fig. 4. Effect of compounds 1a, 2b and 3c, at 10  $\mu\text{M}$  concentration on *T. cruzi* epimastigotes growth.

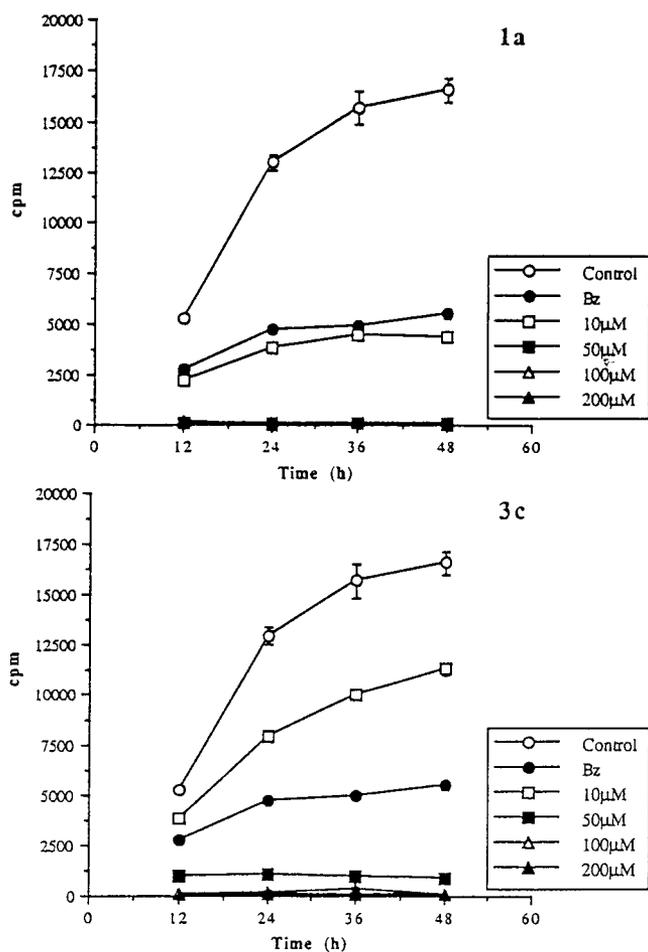


Fig. 5. Effect of different concentrations of compounds 1a and 3c on *T. cruzi* epimastigotes growth.

was also performed. In this case, as shown in Fig. 7, we obtained a significant inhibition of the RNA precursor incorporation by these two parasite stages (significant differences between control cultures and drug-treated parasites:  $P < 5.10^{-2}$  and  $P < 10^{-3}$  for *T. cruzi* amastigotes and trypomastigotes, respectively).

#### 4.3. In vitro neuroleptic activity

Neuroleptic activity of compounds 1a–c, 2a–c and 3a–c was evaluated in vitro according to the protocol described in Material and methods. Specific binding was determined by subtracting non-specific binding (in the presence of 0.1 mM domperidone) from the total binding (in the absence of domperidone). Neuroleptic activity was correlated to the percentage of displacement for the specific binding spiperone  $^3\text{H-D2}$  receptor. Compared to control: Prochlorperazine (81% displacement), results at  $10^{-8}$  M were as follows: 1a: 6%; 1b: 0%; 1c: 0%; 2a: 18%; 2b: 9%; 2c: 6%; 3a: 26%; 3b: 22%; 3c: 0%.

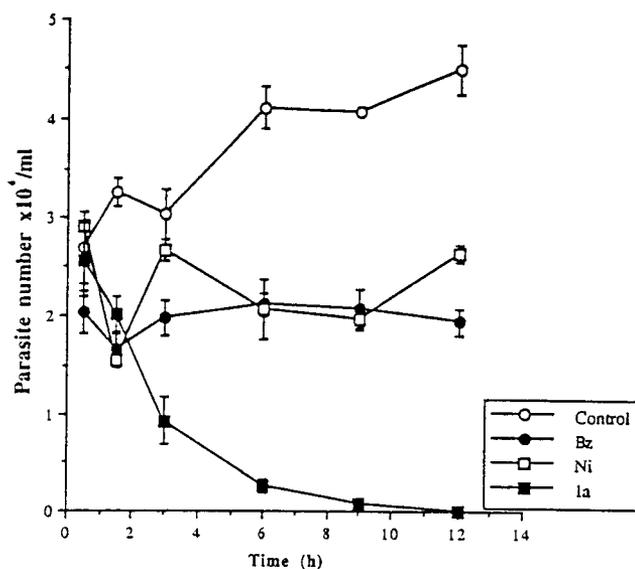


Fig. 6. Effect of benznidazole (Bz), nifurtimox (Ni) and compound 1a on *T. cruzi* epimastigotes growth.

## 5. Discussion

Several independent screening and molecular modelling studies have led to the discovery that phenothiazines and tricyclic antidepressant drugs are effective against epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi* [18–23]. Molecular modelling studies performed by docking fragments into the binding pocket of TR led to the hypothesis that these drugs could be accommodated at the hydrophobic wall site which represents the main difference between TR and GR. This was confirmed by subsequent assay against the enzyme in which typical neuroleptics, clomipramine, an imipramine and trifluoroperazine a phenothiazine (Fig. 8) were found to be linear competitive inhibitors of TR with reported  $K_i$  of respectively  $7 \mu\text{M}$  and  $22 \mu\text{M}$  [17]. These findings were confirmed in our random screening program by the discovery that three other phenothiazine derivatives were endowed with significant TR activity (unpublished results). Unfortunately, due to their intrinsic neuroleptic activity, these compounds could not be considered for clinical use as the doses required to affect *T. cruzi* are evaluated for instance at least about four times higher than those tolerated by humans in the case of chlorpromazine or trifluoroperazine [24]. Interestingly, the 2-amino-diphenylsulfide derivatives 1a to 3c among which some are endowed with inhibiting capacity comparable to the best tricyclic neuroleptics cited above, had been synthesized almost thirty years ago in our laboratory as an attempt to apply Dodd's theory of open cycles to phenothiazines. According to this theory, 2-amino-diphenylsulfides could be considered as phenothiazine structural analogs in which the constraint imposed by the central ring had been suppressed. The fact

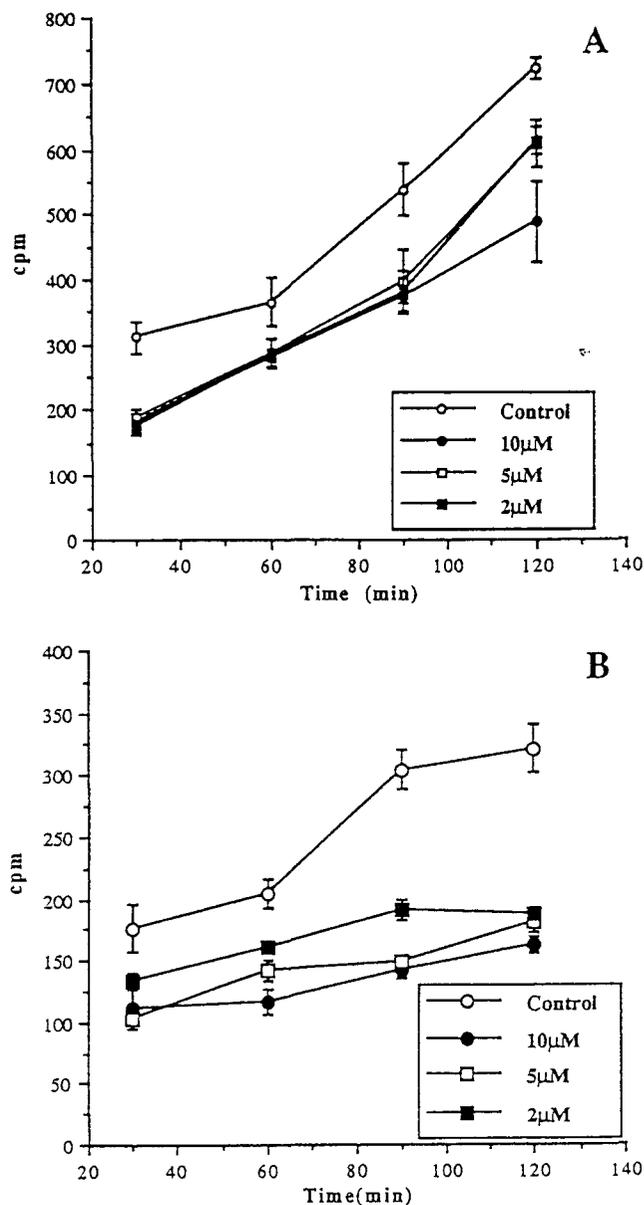


Fig. 7. Dose-dependent inhibition of <sup>3</sup>H-uridine incorporation by *T. cruzi* amastigotes (A) and trypomastigotes (B), caused by the compound 1a.

that none of these compounds had shown any significant neuroleptic activity at the time in the pharmacological tests used (mobility, curiosity, balance) becomes for our purpose, a clear advantage. Moreover, this was confirmed by binding experiments on the D2 receptor using prochlorperazine as control in which our derivatives at 10<sup>-8</sup>M led to a weak or non significant displacement. This in vitro assay correlates with in vivo models like inhibition of apomorphine stereotypy in rats. However, the metabolism of the drug may influence this correlation. The maximal value observed for the displacement of the radioligand is 22–26%; it is close to the limit of sensibility (estimated at 20%) in the binding assay and

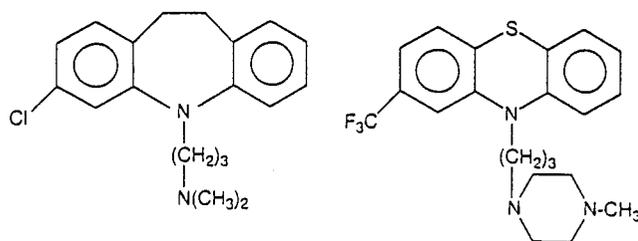


Fig. 8. Structures of clomipramine and trifluoroperazine.

therefore does not lead to predict some side-effects in an animal model.

Together, these results indicate that, although the angle formed by the two benzenic rings in phenothiazines has been shown to be of considerable importance for their neuroleptic activity, this constrain is not an absolute requirement for TR inhibition so that both activities can be easily dissociated. By contrary, the presence of the tertiary amine group in the alkyl side chain appears to be a common requirement to all these derivatives probably extending backwards from the hydrophobic wall toward the general direction of the active site. These observations make 2-amino-diphenylsulfides as well as other phenothiazine analogues which show low neuroleptic activities attractive candidates as TR inhibitors and antichagasic drugs.

#### Acknowledgments

Rodolfo Fernandez-Gomez is a recipient of a Venezuelan CONICIT-BID fellowship. Mireille Moutiez is a recipient of a Centre National de la Recherche Scientifique and Region Nord-Pas de Calais fellowship.

#### References

- [1] Moncayo A. Chagas' disease. In: Tropical Disease Research 9th Programme. Report of the UNDP/World Bank/WHO. World Health Organization, Geneva, 1993.
- [2] Gorla NB, Ledesma OS, Barbieri G and Larriba IB. Thirteen fold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mut Res* 1989;224:263–267.
- [3] Gorla NB, Ledesma OS, Barbieri G, Larriba IB. Assessment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. *Mut Res* 1988;206:212–220.
- [4] Nagel R. Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. *Mut Res* 1987;191:17–20.
- [5] Teixeira ARL, Silva R, Cunha N, Santana JM, Rizzo LV. Malignant non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi* infected rabbits treated with nitroarenes. *J Comp Pathol* 1990;103:37–48.
- [6] Gutteridge WE. New anti-protozoal agents. *Int J Parasitol* 1987;17:121–129.
- [7] Fairlamb AH. Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. *Parasitology* 1989;99:S93–S112.

- [8] Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait, BT, Cerami A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 1985;227:1485-1487.
- [9] Walsh CT, Bradley M, Nadeau K. Molecular studies on trypanothione reductase, a target for antiparasitic drugs. *Trends Biochem Sci* 1991;16:305-309.
- [10] Aumercier M, Meziane-Cherif D, Moutiez M, Tartar A, Sergheraert C. A microplate assay for trypanothione reductase inhibitors. *Anal Biochem* 1994;223:161-164.
- [11] El-Waer A, Douglas KT, Smith K, Fairlamb AH. Synthesis of N-benzoyloxycarbonyl-L-cysteinyglycine-3-dimethylamino propylamide disulfide: a cheap and convenient new assay for trypanothione reductase. *Anal Biochem* 1991;198:212-216.
- [12] Ouaisi A, Cornette J and Capron A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol Biochem Parasitol* 1986;19:201-211.
- [13] Santiago AR, Afchain D and Capron A. Specific antigens of *Trypanosoma cruzi* amastigotes and trypomastigotes. *Ann Soc Belge Med Trop* 1981;61:369-378.
- [14] Cornette J, Capron A and Ouaisi MA. *Trypanosoma cruzi*: Fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. *Int Arch Allergy Appl Immun* 1988;86:139-146.
- [15] Fernandez-Gomez R, Zerrouk H, Sebti F, Loyens M, Benslimane B, Ouaisi MA. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. *Toxicol* 1994;32:875-882.
- [16] Baert C. Study of 2-amino diphenylsulfide derivatives. PhD thesis, University of Lille II, Lille, France, 1975.
- [17] Benson TJ, McKie JH, Garforth J, Borges A, Fairlamb AH, Douglas KT. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. *Biochem J* 1992;286:9-11.
- [18] Barioglio SR, Lacuara JL, Oliva PP. Effect of chlomipramine upon mobility of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 1987;73:451-452.
- [19] Croft SL, Walker JJ, Gutteridge WE. Screening of drugs for rapid activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes in vitro. *Trop Med Parasitol* 1988;39:145-148.
- [20] Hammond DJ, Cover B, Gutteridge WE. A novel series of chemical structures active against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Trans Soc Trop Med Hyg* 1984;78:91-95.
- [21] Hammond DJ, Hogg J, Gutteridge WE. Possible control of parasitic transmission by blood transfusion using amphiphilic cationic drugs. *Exper Parasitol* 1985;60:32-42.
- [22] Lacuara JL, Barioglio SR, Oliva et al. Disruption of mitochondrial function as the basis of trypanocidal effect of trifluperazine on *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 1991;47:612-616.
- [23] Tellez-Inon MT, Ulloa RM, Torruella M, Torres HN. Calmodulin and Ca<sup>2+</sup> dependent cyclic AMP phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1985;17:143-153.
- [24] De Castro SL, Soeiro MNC, Meirelles MNL. *Trypanosoma cruzi*: effect of phenothiazines on the parasite and on its interaction with host cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87:209-215.

## **DISCUSSION**

### III. Discussion

La maladie de Chagas est caractérisée par une grande diversité des manifestations pathologiques et épidémiologiques selon les zones d'endémie. Son étiologie est donc complexe, à cause, d'une part de la grande diversité des souches parasitaires et d'autre part, de l'existence de plusieurs genres de vecteurs et d'espèces d'hôtes-réservoirs.

Actuellement, les moyens de lutte contre la maladie de Chagas sont limités au développement de campagnes de prévention et il n'existe que deux drogues qui sont le nifurtimox et le benznidazole, pour traiter la maladie. Tout récemment des résultats ont été obtenus avec une nouvelle molécule, la D0870, un dérivé d'une bis-triazole. Ces résultats, bien qu'encourageants, n'ont été observés que dans un modèle murin et doivent encore être validés dans le traitement des patients chagasiques (Urbina et al., 1996).

Les programmes de contrôle de la maladie de Chagas sont dirigés surtout contre les modes de transmission. Ces programmes ont également pour objectifs d'éradiquer le vecteur et de contrôler la qualité du sang utilisé pour les transfusions. L'usage d'insecticides sous la forme de pulvérisations ou de peintures pour les habitations, a abouti à des résultats positifs dans l'élimination des réduves dans certains pays d'Amérique du sud. L'efficacité de cette méthode a été montrée au Brésil, où le nombre d'insectes vecteurs, *T. infestans*, a été réduit de 97,03 % entre 1983 et 1993 (WHO, 1996).

De même, des méthodes spécifiques et sensibles, comme la PCR, sont utilisées pour mettre en évidence la présence de *T. cruzi* chez les individus infectés, ce qui rend le contrôle de la qualité du sang

encore plus fiable. Cela a permis de diminuer les risques d'infection par transfusion sanguine de 6,5 % en 1982 à 1 % en 1992 au Brésil (WHO, 1996).

Le traitement des patients chagasiques est restreint à l'utilisation de deux nitrocomposés, le nifurtimox et le benznidazole. Ces médicaments semblent être efficaces au cours de la phase aiguë de la maladie, tandis qu'en ce qui concerne la phase chronique les résultats observés sont controversés (de Castro, 1993; Docampo et Moreno, 1985).

Des trypomastigotes sanguicoles résistants de *T. cruzi* ont été obtenus par traitement prolongé au benznidazole de souris infectées. Ces trypomastigotes après plusieurs passages dans des souris conservent leur caractère résistant (Andrade et al., 1977). Récemment, des travaux comparables ont été réalisés *in vitro*, où des formes épimastigotes de *T. cruzi* résistants au benznidazole ont été isolées (Nirdé et al., 1995). Le phénotype résistant de ces formes est conservé lors de la transformation en amastigotes. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres espèces de la famille des Trypanosomatidés (Borst et Ouellete, 1995; Zhang et al., 1993).

Du fait de la grande diversité des souches, il n'est pas exclu qu'apparaissent des hémoflagellés résistants de *T. cruzi* aux traitements actuels.

La recherche de nouvelles substances ayant un effet trypanocide se révèle indispensable, mais leur élaboration nécessite un investissement élevé de la part de l'industrie pharmaceutique. Cet investissement est difficilement envisageable, car il ne serait pas rentable puisqu'il concerne des pays en développement (Gutteridge, 1987; Brener, 1979; Kierszenbaum, 1984). C'est pourquoi, l'étude des

produits d'origine naturelle s'avère primordiale dans la lutte contre la Trypanosomiase américaine (de Castro, 1993).

En effet, les substances d'origines naturelles représentent une source importante de molécules chimiques et organiques, et elles font l'objet de travaux considérables en recherche clinique.

D'ores et déjà, la plupart des substances actives, utilisées contre différentes maladies parasitaires, sont isolées des plantes (Iwu et al., 1994). Par exemple, depuis de nombreuses années la quinine, qui a été purifiée à partir d'écorces d'arbres de l'espèce *Cinchona succirubra*, est utilisée dans le traitement de la malaria. De même l'émetine, isolée des racines de *Cephaelis ipecacuanha*, est efficace contre les amibes.

Par ailleurs, des substances de venins de serpents, ont été étudiées en microbiologie. Ces recherches ont permis notamment, d'isoler des molécules antibactériennes à partir du venin de deux espèces de serpent, *Pseudechis australis* et *Crotalus adamanteus* (Stiles et al., 1991; Skarnes, 1970).

Ces résultats nous ont encouragé à rechercher des substances actives contre *T. cruzi* à partir de venins de serpents. Nous avons initié notre étude sur les venins de *C. cerastes*, *N. haje* et *V. lebetine* avant de nous focaliser sur le venin de *C. cerastes* en raison de son innocuité.

Notre étude *in vitro*, montre une diminution significative de l'incorporation de thymidine tritiée par les formes épimastigotes en présence de venin de *C. cerastes*. Ce résultat suggère une inhibition de la multiplication de ces formes. De la même manière, la diminution significative de l'incorporation de l'uridine tritiée par les formes trypomastigotes et amastigotes de *T. cruzi*, suggère une

inhibition de la transcription en présence de venin, cependant, le mécanisme d'action reste à éclaircir. Au cours des étapes de purification par chromatographie, nous avons isolé des fractions du venin qui se révèlent efficaces contre les formes épimastigotes, et cela à des concentrations moindres. De plus, ces fractions restent actives sur les trois souches de *T. cruzi* testées (souche Y, CL et TEH).

Les fractions isolées comportent donc un ou plusieurs composants, qu'il est nécessaire de purifier d'avantage. L'identification et la caractérisation des molécules contenues dans ces fractions se révèle importante dans le but d'étudier leur mode d'action sur les parasites. Une hypothèse qui pourrait expliquer le mécanisme d'action du venin contre le parasite, est basée sur l'homologie de séquences peptidiques entre le parasite et l'hôte mammifère. Le venin de serpent est biologiquement actif chez le mammifère, suggérant l'existence de récepteurs chez ce dernier. D'autre part, puisque nous observons une activité du venin vis-à-vis du parasite, il n'est pas exclu que ce soit ces séquences peptidiques communes qui sont reconnues par des composants du venin.

Les techniques de biologie moléculaire permettront le clonage des gènes codants pour ces molécules, pour les synthétiser *in vitro*, car il existe une grande variabilité de composition du venin chez une même espèce de serpent.

Dans une seconde approche, nous nous sommes intéressés à des composés qui perturbent le métabolisme du Trypanothion, qui est un tripeptide essentiel pour le maintien du potentiel rédox chez le parasite (Fairlamb, 1991). On sait que ce métabolisme implique trois enzymes, qui sont: la glutathionylspermidine synthétase, la

trypanothion-synthétase et la trypanothion-réductase. Ces enzymes représentent des cibles potentielles pour la chimiothérapie.

Dans cette optique, nos efforts se sont orientés vers l'étude de l'inhibition de la trypanothion réductase (TR). Cette enzyme est particulièrement intéressante pour deux raisons. La première est que l'activité enzymatique de la TR est présente à tous les stades de différenciation de *T. cruzi*, et la seconde, bien que comparable à la Glutathion réductase (GR) de mammifère, la TR a néanmoins un substrat spécifique qui lui est propre (Henderson et Fairlamb, 1987; Fairlamb, 1991).

Différents travaux ont montrés que des composés de type phénotiazine ont un effet trypanocide sur plusieurs membres de la famille des Trypanosomatidés. Ces composés ont une activité neuroleptique et également un effet inhibiteur compétitif de la TR. Cependant, les doses requises pour obtenir une activité trypanocide sont 4 fois plus importantes que celles tolérées par l'homme, ce qui empêche toute application clinique (Gruska et al., 1993; Benson et al., 1992; de Castro et al., 1992; Doyle et Weinbach, 1989; Zilberstein et Dwyer, 1984; Seebeck et Gehr, 1983; Pearson et al., 1982; Elias et Boyer, 1979).

Le criblage d'une pharmacothèque classique nous a permis d'établir que la structure de l'amino-2-diphényl sulfure peut constituer un inhibiteur potentiel de la TR. Les effets neuroleptiques de ce composé sont réduits par rapport aux phénotiazines classiques par une modification de structure, selon la théorie de Dodd, qui consiste en une ouverture du noyau central (amino-2-diphényl sulfure) (Baert, 1975). Les tests que nous avons réalisés avec différents analogues de structure de l'amino-2-diphényl sulfure, nous ont permis d'isoler le

composé **1a** (cf. Article 2) dont l'activité inhibitrice de la TR est proche de celle de l'inhibiteur de référence, la clomipramine. Aussi, ce composé s'avère plus efficace que le nifurtimox et le benznidazole dans son activité trypanocide. Par ailleurs, il est clairement établi que les phénothiazines agissent par inhibition de l'AMPC-Phosphodiesterase de *T.cruzi* (de Castro, 1993). Il serait donc intéressant de tester l'action du composé **1a** sur l'activité de l'AMPC-Phosphodiesterase.

De plus, notre étude montre que, le composé **1a**, est inactif sur la Glutathion réductase du mammifère, ce qui nous permet d'envisager son utilisation *in vivo*. Dans ce sens, en collaboration avec le laboratoire de Toxicologie du Pr. D. Marzin, nous avons déterminé qu'une dose du composé **1a**, comprise entre 100 à 300 mg/kg, ne provoque pas la mort des souris. Cette dose est 77 fois plus importante de celle nécessaire pour obtenir un effet trypanocide *in vitro*. La dose létale pour la souris est quant à elle comprise entre 400 et 500 mg/kg.

Dans la conception d'une chimiothérapie, il est nécessaire de prendre en compte les aspects biologiques du parasite (stades parasitaire de vie), biochimiques (métabolisme spécifique du parasite) et pharmacologiques (comportement du parasite en présence de drogues). Pour le passage de la chimiothérapie expérimentale à l'utilisation clinique, il est important que la substance testée soit active contre les formes pathogènes pour l'homme. Dans ce cadre, les résultats que nous avons obtenus à la fois, avec le venin de *C. cerastes* et le composé chimique **1a**, sur les formes trypomastigotes et amastigotes de *T.cruzi* sont encourageants.

# CONCLUSION

## IV. Conclusion

Au cours de ce travail nous avons cherché à identifier des substances actives contre la multiplication de *T. cruzi*.

Dans un premier temps, l'utilisation d'une substance d'origine naturelle, le venin de serpent, a montré, pour la première fois, une activité cytotoxique sur des formes épimastigotes (présentes chez le vecteur) et sur les formes trypomastigotes et amastigotes (présentes chez l'hôte mammifère) de *T. cruzi*.

Nous avons donc entamé la purification des composants actifs de ce venin. Après plusieurs étapes de purification, nous avons obtenu deux fractions qui, à faibles concentrations, présentent une activité cytotoxique contre le parasite. L'isolement et la caractérisation des molécules présentes dans ces fractions, permettra de mieux comprendre leur(s) mécanisme(s) d'action(s).

Dans un deuxième temps, nous avons cherché des molécules synthétiques capables d'inhiber l'activité de la TR. Cette recherche, réalisée par un criblage d'une pharmacothèque classique, a abouti à l'identification d'une structure chimique capable d'inhiber la TR. Cette molécule, appartenant au groupe des phénotiazines, a été par la suite modifiée par la rupture de l'anneau central. Cette modification a eu comme conséquence une diminution de son effet neuroleptique, tout en conservant son activité vis-à-vis de la TR de *T. cruzi*. Ces résultats permettent d'envisager le développement futur de substances thérapeutiques dérivées de la molécule primaire.

# ANNEXES

## V. Annexes

### A. Toxines du venin des serpents

#### (1) Neurotoxines post-synaptiques

Les structures moléculaires et les propriétés de ces toxines sont les mieux définies parmi tous les constituants des venins et sont isolées exclusivement des venins d'Elapidae (genres: *Pseudechis*, *Acantophis*, *Notechis*, *Naja*, *Ophiophagus*, *Bungarus*, *Dendroaspis* et *Hemachatus*). Certains venins de Viperidae renferment aussi des toxines curarisantes. Leurs poids moléculaires se situent entre 6 et 8 kDa et le nombre d'acides aminés constituant leurs séquences est de 59 à 62 acides aminés pour les chaînes courtes (4 ponts disulfure) et de 66 à 75 acides aminés pour les chaînes longues (4 à 5 ponts disulfure). Leur mode d'action est de type curarisant, c'est-à-dire qu'elles se fixent spécifiquement et quasi-irréversiblement sur les macromolécules réceptrices insérées dans la membrane musculaire à la place du médiateur neuromusculaire : l'acétylcholine. Elles agissent sur le système nerveux autonome en inhibant la dépolarisation, c'est-à-dire le passage de l'excitation électrique au niveau de la jonction neuromusculaire. Ceci a pour effet de bloquer la transmission de l'influx nerveux en aval de la plaque motrice, empêchant ainsi la contraction musculaire et entraînant la paralysie flasque du muscle diaphragmatique et la mort par paralysie respiratoire. Il est à noter que la plupart des venins des Elapidae possèdent plusieurs neurotoxines de structures moléculaires similaires.

## (2) Neurotoxines pré-synaptiques

Elles se subdivisent en deux classes. Les premières, hautement toxiques, empêchent la libération de l'acétylcholine, bloquant ainsi la transmission nerf-muscle. On rencontre ces toxines dans les venins de certains Elapidae tels que ceux d'Australie et les Bungares asiatiques, mais aussi dans les venins des Viperidae et de quelques Crotalidae. Les toxines curarisantes et les toxines pré-synaptiques coexistent parfois dans un même venin, c'est le cas, des venins de certains Cobras australiens.

Les secondes toxines pré-synaptiques appelées toxines facilitatrices accroissent la libération du médiateur. On les rencontre uniquement dans les venins de certains Elapidae africains: les Mambas.

## (3) Fasciculines

Ce sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, enzyme qui dégrade l'acétylcholine. Les toxines facilitatrices augmentent la concentration d'acétylcholine synaptique, les fasciculines en préviennent la dégradation. Ceci est traduit physiologiquement par des tremblements musculaires non coordonnés qui sont suivis d'une paralysie. Des expériences de pharmacologie mettant en oeuvre le venin de *Dendroaspis* suggèrent que ce dernier contient un composant qui augmente l'action de l'acétylcholine.

## (4) Myotoxines

Elles sont présentes dans les venins d'Elapidae, de Viperidae, de Crotalidae et peut-être d'Hydrophidae. Ce sont des polypeptides basiques dont le poids moléculaire varie de 6 à 14 kDa et dont les structures ressemblent à celles des neurotoxines post-synaptiques. Elles affectent la perméabilité et l'intégrité des membranes de divers

types de cellules et de tissus. Leur mode d'action est d'induire la contracture des muscles squelettiques ou myonécroses ou myoglobininurie.

### **(5) Cardiotoxines**

Elles représentent un groupe riche en cystéine. Ces toxines de 21 acides aminés causent des contractions des muscles cardiaques et squelettiques, pouvant entraîner l'arrêt du coeur en systole.

### **(6) Cytotoxines**

Ce sont des polypeptides de 60 à 62 acides aminés avec 4 ponts disulfure. Elles provoquent la cytolyse des hématies ainsi que des myonécroses. Leur activité serait due à un blocage de la dépolarisation membranaire, irréversible par libération du calcium. Il y aurait également potentialisation de ces propriétés par les phospholipases A<sub>2</sub>, dont les produits d'hydrolyse, les lysophosphatides, augmentent encore les effets. Les cytotoxines sont présentes dans tous les venins des Elapidae et des Viperidae étudiés.

### **(7) Toxines dont les activités sont mal définies**

A ce groupe appartiennent des toxines isolées d'espèces particulières. Du venin de *Crotalus durissus terrificus crotaminicus* a pu être isolé la crotamine, polypeptide acide de 42 acides aminés. Cette crotamine agirait sur les membranes musculaires en intervenant sur la perméabilité et son action serait inhibée par le calcium et le magnésium. D'autres venins de Crotalidae possèdent différentes toxines de types et d'activités variés.

## **B. Enzymes du venin des serpents**

### **(1) Phospholipases (PLA2)**

Les phospholipases (Rosenberg, 1979) nommées également lécithinases ou hémolysines, sont isolées de tous les venins, y compris ceux des abeilles et des scorpions. Ces polypeptides sont les composants les plus nocifs du venin de serpent; ils sont très hétérogènes et leurs activités sont multiples et puissantes. Les PLA2 se présentent sous forme de mono ou de dimères selon un équilibre dépendant du calcium. Elles hydrolysent les liaisons des esters carboxyliques. Il en existe souvent plusieurs dans un même venin (*Naja nigricollis* en possède 6). Leurs molécules se composent de 108 à 140 acides aminés, leurs poids moléculaires varient de 10 à 50 kDa. Elles sont thermostables. Après extraction, les PLA A2 peuvent être classées en 4 groupes:

- ◆ Les phospholipases A2 sous forme monomérique.
- ◆ Les phospholipases A2 de tri ou tétramérique.
- ◆ Les phospholipases A2 liées de façon covalente à un polypeptide.
- ◆ Les phospholipases A2 complexées à des polypeptides ou protéines activateurs ou inhibiteurs de leur activité.

La principale caractéristique des PLA2 est l'hydrolyse de la lécithine sérique (phosphatidylcholine) en scindant la molécule de ce phosphoglycéride au niveau de la liaison 2. Ainsi, l'action des PLA2 est essentiellement dirigée contre les phospholipides membranaires. Le processus serait le suivant : l'enzyme se lierait au calcium avant sa liaison aux phospholipides; cette liaison causerait un changement de conformation de l'enzyme qui entraînerait sa dimérisation. Un deuxième phospholipide se lierait ensuite au dimère sur un site

fonctionnel actif, c'est alors que l'hydrolyse se produirait. Seul le site actif semble intervenir dans la réaction et non l'acide gras en cette position. Elles inhiberaient les enzymes respiratoires mitochondriales et interviendraient puissamment par potentialisation de l'action d'autres constituants des venins. Certaines PLA2 auraient, en outre, la faculté de poursuivre l'hydrolyse des phosphoglycérides, présentant ainsi une activité phospholipasique B.

## (2) Protéases

Elles constituent un groupe incluant des peptidases et des protéinases. La plupart de ces enzymes sont rencontrées dans les venins de Viperidae. Chez les Elapidae, seules les peptidases sont présentes. Elles sont classées en endopeptidases et exopeptidases non spécifiques et protéases spécifiques d'un substrat.

### (a) *Les endopeptidases*

Ce sont des glycoprotéines de poids moléculaire de 21 kDa, thermostables, qui sont isolées de Viperidae et hydrolysent un grand nombre de substrats (caséine, hémoglobine, élastine, collagène, fibrinogène).

### (b) *Les exopeptidases*

Ces 2 types de peptidases sont très faiblement toxiques, mais elles interviennent puissamment sur l'hémostase. Elles peuvent provoquer des hypo ou des hypercoagulations sanguines par la présence d'enzymes thrombiniques qui agissent sur le fibrinogène (dont l'action n'est pas inhibée par l'héparine) et d'enzymes activatrices de la prothrombine, des facteurs V et X. Elles causent également de graves nécroses et parfois des ulcérations viscérales.

**(c) *Les arginine-ester-hydrolases***

Ce sont des glycoprotéines qui provoquent de l'hypotension et augmentent la perméabilité capillaire favorisant la formation d'oedèmes. Elles sont rencontrées principalement dans les venins de Viperidae.

**(d) *Les kinogénases***

Elles sont isolées de certains venins de Viperidae et de Crotalinae. Elles libèrent la bradykinine qui provoque de l'hypertension, agit sur la perméabilité vasculaire et qui est en partie responsable de la douleur ressentie lors d'une morsure. Son action est inhibée par l'aprotinine.

**(3) *Hyaluronidases***

Elles se trouvent dans tous les venins et d'une façon générale dans la plupart des liquides biologiques. Elles hydrolysent les liaisons glycosidiques de certains acides mucopolysaccharides du tissu conjonctif.

**(4) *Acétylcholinestérases***

Cette activité a été détectée pour la première fois dans le venin de cobra potentialisant l'action des neurotoxines dont elles sont distinctes. Ces enzymes sont isolées uniquement des venins des Elapidae.

**(5) *Acides-amino-oxydases***

Ce sont des oxydo-réductases de nature glycoprotéinique d'un poids moléculaire de 85 à 150 kDa , composées de sous-unités dont le groupement prosthétique est une flavine-adénine-dinucléotide. Elles sont isolées de tous les venins jaunes, leurs toxicités sont très faibles.

Ces enzymes hydrolysent les acides aminés et les transforment en acides- $\alpha$ -cétoniques.

### **(6) Phosphoestérases**

Elles forment un groupe d'enzymes hydrolysant les esters mono ou diphosphoriques. La plupart des venins contiennent des endonucléases, des exonucléases, des 5' nucléotidases et des phosphomonoestérases plus ou moins spécifiques. Elles ont une activité exonucléase.

Les 5'nucléotidases sont des phosphomonoestérases spécifiques qui catalysent le clivage hydrolytique de 5' AMP en adénosine et phosphate. Les venins de serpents contiennent aussi deux types de phosphomonoestérases non spécifiques hydrolysant un nombre important de composés tels que l'ATP ou le glucose-1-phosphate.

### **(7) Inhibiteurs d'enzymes**

Il s'agit d'enzymes protéolytiques spécifiques ou non, qui inactivent d'autres systèmes enzymatiques (deshydrogénases du cerveau et du coeur, cytochrome-oxydase du cerveau, choline-oxydase du foie). Un inhibiteur spécifique des PLA2 a été trouvé dans le venin de *Naja haje* et de plusieurs venins de Bothrops, il cause un effet retard à l'action des phospholipases. A partir du venin de *Naja n. atra*, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase a pu être isolé, ainsi que des inhibiteurs de protéases provenant des venins de *Dendrospis*, de *Naja* et de *Vipera russelli*

### **(8) Facteurs agissant sur la coagulation sanguine**

L'action des venins sur l'hémostase a été observée dès le début du XVIIIème siècle et a été étudiée pour la première fois par Calmette,

Césari et Boquet au début du XXème siècle.

Aujourd'hui, plus de 70 protéines de plasma humain ont été identifiées et contribuent essentiellement au maintien de l'équilibre hémostatique.

Les venins de serpents contiennent des composants protéiques, agissant comme pro-coagulants ou anticoagulants, à plusieurs niveaux de l'hémostase.

### **(9) Facteurs agissant sur les plaquettes sanguines**

Un certain nombre de protéines des venins de serpents agissent sur l'agrégation plaquettaire, sur la libération de substances ou sur la rétraction du caillou plaquettaire.

#### **(a) Composants enzymatiques**

##### **(i) Phospholipase A2**

Certaines enzymes sont des activateurs plaquettaires, c'est le cas de PLA2, issue du venin de *Agkistrodon c. contortrix* (Takagi et al., 1988) et de *Crotalus terrificus terrificus*. D'autres PLA2 ont un effet anticoagulant tel *V.russeli* et *Naja n. atra*.

##### **(ii) 5'- Nucléotidases**

Les 5' nucléosides purine et pyrimidine mono et diphosphate existent dans les venins de nombreux serpents. Un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire purifié à partir du venin de *Trimeresurus gramineus* est identifié comme étant une 5' nucléotidase (Ouyang et al., 1983).

##### **(iii) Protéinases**

La majorité des venins de Crotalinae et de nombreux Viperinae contiennent des protéinases qui exercent une ou plusieurs activités

sur le multifonctionnement de la thrombine-protéinase du plasma. Le venin de *B.atrox* contient une protéinase : la thrombocytine (Kirby et al., 1979) ayant un effet activateur sur les plaquettes. La crotalocytin: un activateur plaquettaire a été isolé du venin de *C. h. horridus* (Schmaier et al., 1980).

**(b) Composants non enzymatiques agissant sur les plaquettes**

**(i) Inhibiteurs de l'agrégation**

Un polypeptide riche en carbone a été isolé à partir du venin de *Echis carinatus* le "carinatin". Le venin de *T. gramineus* contient la trigramine ayant un effet inhibiteur (Huang et al., 1987).

**(ii) Facteurs activant des plaquettes**

La convulxine a été isolée de *C.durissus terrificus*. L'agrégoserpentine correspond au facteur activant les plaquettes issues du venin de *Trimeresurus* (Ouyang et al, 1980, 1983). D'autres protéines ont été découvertes telle la coaglutinine qui a le même effet que la ristocytine et botrocetine, utilisés comme agents de diagnostic dans le test de VWF dans le plasma humain (lectine lactose spécifique qui cause l'agrégation des cellules rouges du sang fixé par le formol).

**(iii) Facteurs agissant sur la paroi vasculaire**

Le saignement cutané ou subcutané au niveau du lieu de morsure est dû aux protéines hémorragiques existant dans le venin de *Viperidae*. La plupart de ces protéines sont des métalloprotéines contenant du zinc comme cofacteur essentiel. Elles attaquent les composants de la membrane basale de la paroi des vaisseaux avec différents substrats protéolytiques. Des données plus récentes ont montré que toutes ces

protéines ont une activité protéolytique sur la caséine et le diméthylcaséine.

**(iv) Facteurs agissant sur les  
cellules endothéliales**

La thrombocytine (*Bothrops atrox*), protéine sérine qui agrège les plaquettes et qui stimule comme la thrombine, la libération de prostaglandine I<sub>2</sub> à partir de cellules endothéliales de la corde ombilicale humaine. De plus, la thrombocytine induit une relaxation endothéliale dépendante de l'artère coronaire porcine du segment pré-contracté avec la prostaglandine F<sub>2</sub>; il existe un autre type de protéine avec 21 a.a et un taux élevé en cystéine, la Sarafotoxine. Toutes ces protéines sont des homologues des endothélines, peptides vasoactifs existants dans les cellules endothéliales.

**(v) Facteurs agissant sur  
l'activation de la  
prothrombine**

De nombreux venins contiennent des activateurs de prothrombine. Selon leur propriété, 3 types d'activateurs sont distingués:

- ◆ Activateurs dont l'effet n'est pas influencée par les cofacteurs non enzymatiques du complexe prothrombinase et qui convertissent la prothrombine en une meizothrombine active enzymatiquement (par exemple: ecarine, issue du venin de *Echis carinatus*).
- ◆ Activateurs dont l'effet est hautement augmentée par la présence de phospholipides, ions calcium et par le facteur V.
- ◆ Activateurs dont l'activité est augmentée par la présence de phospholipide set ions calcium.

**(vi) Facteurs agissant sur le  
fibrinogène**

De nombreux venins de Viperidae contiennent des protéinases serine qui convertissent le fibrinogène en fibrine. Ces composants sont des enzymes "thrombin-like". Le venin de certains Viperidae et Elapidae contient des protéinases ayant une action fibrin(ogen)olytique (Retzios et Markland, 1988).

**(vii) Facteurs agissant sur la  
protéine C**

Ces activateurs indépendamment de cofacteurs, activent directement la protéine C qui est un anticoagulant physiologique potentiel.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## VI. Bibliographie

**Andrade, SG et Figueira, RM** (1977). Estudo experimental sobre a ação terapêutica da droga Ro 7-1051 na infecção por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, **19** (5), 335.

**Andrade, SG et Figueira, RM** (1977). Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* ao Bay 2502. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, **19** (2), 124.

**Andrews, N; Hong, K; Robbins, E et Nussenzweig, V** (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, **64**, 474.

**Baert, C** (1975). Etude de dérivés 2-amino diphenylsulfure. PhD. Université de Lille II.

**Benson, TJ; McKie, JH; Garforth, J; Borges, A; Fairlamb, AH; Douglas, KT** (1992). Rationally designed selective inhibitors of trypanothion reductase. Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. *Biochemical Journal*, **286**, 9-11

**Borst, P et Ouellette, M** (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology*, **49**, 427.

**Brener, Z** (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, **27**, 347.

**Brener, Z; Costa, C et Chiari, C** (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, **18** (6), 450.

**Brener, Z** (1979). Presents status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the western hemisphere. *Pharmaceutical Therapie*, **7**, 71.

**Brener, Z** (1980). Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Parasitology*, **18**, 247.

**Bryant, C et Behm, C** (1989). Biochemical adaptation in parasites. (Chapman and Hall, London), 259.

**Capron, A et Dessaint, J** (1992). Survival strategies of parasites in their immunocompetent hosts. *Advances in Neuroimmunology*, **2**, 181.

**Chippaux, JP; Williams, V et White, J** (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, **29**, 1279.

**Chippaux, JP et Goyffon, M** (1991). Production and use of snake antivenoms. (Marcel Dekker Inc., New-York), **5**, 529.

**Cornette, J; Capron, A et Ouaisi, M** (1988). Trypanosoma cruzi: fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. *International Archives of Allergy applications in Immunology*, **86**, 139.

**Croft, SL** (1994). A rationale for antiparasite drug discovery. *Parasitology Today*, **10** (10), 385.

**Cueva, I et Romero, S** (1987). Estudio epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en la provincia de Loja. En: Los problemas de Salud en el Ecuador. Departamento de atención en Salud de la Dirección Nacional del Seguro Campesino. 151.

**Cunha-Neto, E; Duranti, M; Gruber, A; Zingales, A; D'Messias, I; Stolf, N; Bellotti, G; Patarroyo, M; Pilleggi, F et Kalil, J** (1995). Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy biological relevance of a cardiac myosin specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proceeding of the National Academy of Science*, **92**, 3541.

**Daltry, J; Wüster, W et Thorpe, R** (1996). Diet and snake venom evolution. *Nature*, **379** (8), 537.

**Darman, M** (1941). Multiplication du *Trypanosoma cruzi* dans le sang périphérique de la souris par passages successifs. Recherche de la prémunition vis-à-vis des souches homologues et hétérologues. *Annales de Parasitologie*, **18**, 166.

**de Castro, S; Nazaré, Met De Meirelles, M** (1992). *Trypanosoma cruzi*: Effect of phenothiazines on the parasite and its interaction with host cells. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **87** (2), 209.

**de Castro, S** (1993). The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, **53**, 83.

**de Rezende, J** (1975). Chagasic mega syndromes and regional differences. In "New approaches in american Trypanosomiasis research" Organization, P. A. H. ed. (World Health Organization, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), **318**, 195.

**Deane, MP; Lenzi, HL et Jansen, AM** (1986). Double development cycle of *Trypanosoma cruzi* in the opossum. *Parasitology Today*, **2**, 146.

**Del Castillo, M; Mendoza, G; Oviedo, J; Perez Bianco, RP; Anselmo, AE et Silva, M** (1990). AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. *The American Journal of Medicine*, **88**, 693.

**Detrait, J et Duguay, R** (1966). Variation de toxicité du venin au cours du cycle annuel chez *Viperas aspis*. *Annales de L'Institut Pasteur*, **111**, 93.

**Docampo, R et Moreno, S** (1985). Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of american trypanosomiasis (Chagas' disease). *Reviews of Biochemical Toxicology*, **7**, 159.

**Doyle, PS et Weinbach, EC** (1989). The activity of tricyclic antidepressant drugs against *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, **68**, 230.

**Eisen, H et Kahn, S** (1991). Mimicry in *Trypanosoma cruzi*: fantasy and reality. *Current Opinion in Immunology*, **3**, 507.

**Elias, E et Boyer, JL** (1979). Chlorpromazine and its metabolites alter polymerization and gelation of actin. *Science*, **206**, 1404.

**Fairlamb, AH** (1991). Trypanothione metabolism in the chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. In "Molecular &

Immunological Aspects of Parasitism" Wang, C. C. ed. (American Association for Advancement of Science, Washintong, DC), 107.

**Fairlamb, AH et Cerami, A** (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastidia. *Annual Review of Microbiology*, **46**,695.

**Faure, G et Bon, C** (1987). Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, **25**, 229.

**Faure, G; Choumet, V; Bouchier, C; Camoin, L; Guillaume, J; Monegier, B; Vuilhorgne, M et Bon, C** (1994). The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *European Journal of Biochemistry*, **223** (1), 161.

**Ferrari, I; Levin, M; Wallukat, G; Elies, R; Lesbegue, D; Chiale, P; Elizari, M; Rosenbaum, M et Hoebeke, J** (1995). Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor. *Journal of Experimental Medecine*, **182** (July), 59.

**Gea, S; Ordonez, P; Cerban, F; Iosa, D; Chizzolini, C et Vottero-Cima, E** (1993). Chagas' disease cardioneuropathy: association of anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-sciatic nerve antibodies. *American Journal Tropical of Medicine and Hygiene*, **49** (5), 581.

**Gluckstein, D; Ciferri, F et Ruskin, J** (1992). Chagas' disease: Another cause of cerebral mass in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *The American Journal of Medecine*, **92** (April), 429.

**Goldberg, S; Cordeiro, M; Silva-Pereira, A et Maresguia, M** (1983). Release of lipopolysaccharide (LPS) from cell surface of *Trypanosoma cruzi* by EDTA. *International Journal of Parasitology*, **13**, 11.

**Gruska, A; Franke, R; Vogel, M; Herrmann, D; Hegenscheid, B et Presber, W** (1993). Substructures of CNS pharmaceuticals show additional antiprotozoan action. *Pharmazie*, **48**, 950.

**Guevara, A; Taibi, A; Alava, J; Guderian, R et Ouaisi, A** (1995). Use of a recombinant *Trypanosoma cruzi* protein antigen to

monitor cure of Chagas' disease. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**, 447.

**Guteridge, W** (1987). New anti-protozoal agents. *International Journal Parasitology*, **17**, 121.

**Hagar, JM et Rahimtoola, SH** (1991). Chagas' heart disease in the United States. *The New England Journal of Medicine*, **325**, 763.

**Hawgood, B et Bon, C** (1991). Snake venom presynaptic toxins. *Reptile venoms and toxins*, **5**, 3.

**Henderson, GB et Fairlamb, AH** (1987). Trypanothione metabolism: a chemotherapeutic target in trypanosomatids. *Parasitology Today*, **3** (10), 312.

**Hoare, C** (1972). The trypanosomes of mammals. (Blackwell Scientific Publications, Oxford), 749.

**Hoff, R; Teixeira, RS; Carvalho, JS et Mott, KE** (1978). *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. *The New England Journal of Medicine*, **298** (11), 604.

**Holland, BK** (1994). Prospecting for drugs in ancient texts. *Nature*, **369**, 702.

**Hontebeyrie-Joskowicz, M** (1993). Immunopathologie de la trypanosomiase américaine. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, **91**, 75.

**Huang, TF; Holt, JC; Lukasiewicz, H et Niewiarowski, S** (1987). Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *The Journal of biological chemistry*, **262**, 16157.

**Iwanga, S et Suzuki, T** (1979). Enzymes in snake venoms. *Handbook of experimental Pharmacology*, **52** 61.

**Iwu, MM; Jackson, JE et Schuster, BQ** (1994). Medicinal plants in the fight against *Leishmaniasis*. *Parasitology Today*, **10** (2), 65.

**Jayanthi, G et Veerabasapa Gowda, T** (1988). Geographical variation in India in the composition and lethal potency of Russel's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon*, **26**, 257.

**Jeanblanc, A et Delesalle, T** (1996). La mer, source de médicaments. *Actualités, Innovations-Médecine*, **29**, 27.

**Karlsson, E** (1979). Chemistry of protein toxins in snake venoms. (Springer Verlag), **52**, 159.

**Kierszenbaum, F** (1984). The chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease). In "The chemotherapy" Manfield, J. M. ed. (Marcel Dekker Inc, New York), **2**, 133.

**Kirby, EP; Niewiarowski, S; Stocker, K; Kettner, C; Shaw, E et Brudzynski, TM** (1979). Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. i. Purification and characterization of the enzyme. *Biochemistry*, **18**, 3564.

**Kornalik, F et Master, RWP** (1964). A comparative examination of yellow and white venoms of *Vipera ammodyes*. *Toxicon*, **2**, 109.

**Lamotte, M** (1995). Les fondements écologiques des mécanismes de l'évolution. *Bulletin de la Société zoologique de France*, **120** (4), 315.

**Levine, ND; Corliss, JO; Cox, FE; Deroux, G; Grain, Honiberg, BM; Leedale, GF; Loeblich, AR; Lom, J; Dynn, DMerinfeld, EG; Page, FC; Polansky, G; Sprague, V; Vavra, J et Wallace, FG** (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *The Journal of Protozoology*, **27**, 37.

**Lévi-Strauss, C** (1962). La pensée sauvage. (Plon, Paris), 389.

**Lowndes, CM; Bonaldo, MC; Thomaz, N et Goldenberg, S** (1996). Heterogeneity of metalloprotease expression in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, **112**, 393.

**Marckwell, MAH; Haas, SM; Bieber, LL et Tolbert, NE** (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, **87**, 106.

**Markland, JFS** (1988). Fibrinolytic enzymes from snake venoms. (Pirkle H., Markland Jr FS., New-York), **7**, 147.

**Marr, JJ et Docampo, R** (1986). Chemotherapy for Chagas' disease: A perspective of current therapy and considerations for future research. *Reviews of Infectious Diseases*, **8** (6), 884.

**Marr, JJ et Ullman, B** (1995). Concepts of chemotherapy. In "Biochemistry and Molecular Biology of Parasites." (Academic Press, London), 323.

**Marsden, PD** (1988). South American Trypanosomiasis and Leishmaniasis: endemic diseases of continental dimensions affecting poor, neglected, and underfunded people. In "The biology of parasitism. A molecular and immunological approach" Sher, P. T. E. a. A. ed. (Alan R. Liss, Inc., New-York), 9, 77.

**Marsden, PD** (1996). American Trypanosomiasis. In "Manson's tropical diseases" Cook, G. C. ed. (WB Saunders Company Ltd, London), **Twentieth edition**, 1197.

**Mc Ghee, RB et Cosgrove, WB** (1980). Biology and physiology of the lower Trypanomatidae. *Microbiological Reviews*, **44**, 140.

**McKenzie, J** (1985). The genetics of resistance to chemotherapeutic agents. In "Nematodes to Anthelmintic Drugs" Waller, N. A. a. P. J. ed. (Sidney, Australia), 89.

**Meier, J** (1990). Venomous snakes. In "Medical use of snake venom proteins" Stocker, K. F. ed. (CRC Press, Boca Raton), 1.

**Meister, A** (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of Biological Chemistry*, **263** (33), 17205.

**Meister, A** (1995). Glutathione metabolism. In "Biothiols. Part A" Packer, L. ed. (Academic Press, London), **251**, 3.

**Minoprio, P; Burlen, O; Pereira, P; Guilbert, B; Andrade, L; Hontebeyrie-Joskowicz, M et Coutinho, A** (1988). Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scandinavian Journal of Immunology*, **28**, 553.

**Minoprio, P; Coutinho, A; Spinella, S et Hontebeyrie-Joskowicz, M** (1991). The Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease. *International Immunology*, **3**, 427.

**Molyneux, DH et Ashford, RW** (1983). The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. (Taylor and Francis, London), 293.

**Moncayo, A** (1993). Chagas Disease. In "Tropical Disease Research. Progress 1991-92" WHO/TDR ed. (World Health Organization, Geneva), 67.

**Morello, A** (1988). The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comptes In Biochemistry and Physiology*, **90C** (1), 1.

**Murgolo, N; Cerami, A et Henderson, G** (1990). Trypanothione. In "Parasites: Molecular Biology, Drug and Vaccine Design" Wiley-Liss, I. ed. London), 263.

**Navin, T; Roberto, RR; Juranek, DD; Khanchit, L; Mortenson, EW; Clover, JR; Yescott, RE; Taclindo, C; Steurer, F et Allain, D** (1985). Human and Sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in California. *The American Journal of Public Health*, **75** (4), 366.

**Nelson, G** (1988). Parasitic zoonoses. In "The biology of parasitism. A molecular and immunological approach" Sher, P. T. E. a. A. ed. (Alan R. Liss, Inc., New-York), **9**, 13.

**Nirdé, P; Larroque, C et Barnabé, C** (1995). Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, **318**, 1239.

**Nogueira, N et Coura, J** (1984). American Trypanosomiasis (Chagas's disease). In "Tropical and Geographical Medecine" Mahmoud, K. S. W. a. A. A. F. ed. (McGraw-Hill, New York), 253.

**Nozaki, T et Dvora, JA** (1993). Intraspecific diversity in the response of *Trypanosoma cruzi* to environmental stress. *The Journal of Parasitology*, **79** (3), 451.

**Ochs, D; Hnilica, V; Moser, D; Smith, J et Kirchhoff, L** (1996). Postmortem diagnosis of autochthonous acute chagasic myocarditis by polymerase chain reaction amplification of a species-specific DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **54** (5), 526.

**Oddo, D; Casanova, M; Acuna, G; Ballesteros, J et Morales, B** (1992). Acute Chagas' Disease (Trypanosomiasis americana) in Acquired Immunodeficiency Syndrome: report of two cases. *Human Pathology*, **23** (1), 41.

**Ouaissi, A; Cornette, J; Velge, P et Capron, A (1988).** Identification of anti-acetylcholinesterase and anti-idiotypic antibodies in human and experimental Chaga's disease: pathological implications. *European Journal of Immunology*, **18**, 1889.

**Ouaissi, MA (1993).** *Trypanosoma cruzi*: Maladie de Chagas. *Encyclopedie Medico-Chirurgicale*, 8.

**Ouyang, C et Huang, TF (1980).** Potent platelet aggregation inhibitor from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Biochimica Biophysica Acta.*, **757**, 332.

**Ouyang, C et Huang, TF (1983).** Inhibition of platelet aggregation by 5'-nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Toxicon*, **21**, 491.

**Pearson, RD; Manian, AA; Marcus, JL; Hall, D et Hewlett, EL (1982).** Lethal effect of phenothiazine neuroleptics on the pathogenic protozoan *Leishmania donovani*. *Science*, **217**, 369.

**Pestel, J; Defoort, JP; Gras-masse, H; Afchain, D; Capron, A; Tartar, A et Ouassi, A (1992).** Polyclonal cell activity of a repeat peptide derived from the sequence of an 85-kilodalton surface protein of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes. *Infection and Immunity*, 715.

**Peters, W (1985).** The problem of drug resistance in malaria. *Parasitology*, **90**, 705.

**Prata, AR (1975).** Natural history of chagasic cardiomyopathy. In "New approaches in american Trypanosomiasis research" Organization, P. A. H. ed. (World Health Organization, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), **318**, 191.

**Pung, OJ; Banks, CW; Jones, DN et Krissinger, MW (1995).** *Trypanosoma cruzi* in wild raccoons, opossums and triatomine bugs in southeast Georgia, U. S. A. *The Journal of Parasitology*, **81** (2), 324.

**Retzios, A et Markland, F (1988).** A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*: effects on various components of the human blood coagulation and fibrinolysis systems. *Thromb Research*, **52** (6), 541.

**Rocha, A; De Meneses, ACO; Da Silva, MA; Ferreira, MS; Nishioka, SA; Burgarelli, MKN; E., A; Turcato JR, G; Metze, K**

- et Lopes, ER** (1994). Pathology of patients with Chagas disease and acquired immunodeficiency syndrome. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **50**(3), 261.
- Roitt, I** (1994). *Essential Immunology*. (Blackwell Scientific Publications, Oxford), 448.
- Rosenberg, P** (1979). Pharmacology of phospholipase A2 from snake venoms. *Snake Venoms*, **52**, 403.
- Said, G; Joskowicz, M; Barreira, AA et Eisen, H** (1985) Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. *Annals of Neurology*, **18** (6), 676.
- Saint-Girons, H et Detrait, J** (1978). Communautés antigéniques des venins et systématique des vipères européennes. Etude immunoélectrophorétique. *Bulletin de la Société de Zoologie de France*, **103**, 155.
- Schlemper, B; Chiari, E et Brener, Z** (1977). Growth-inhibition drug test with *Trypanosoma cruzi* culture forms. *The Journal of Protozoology*, **24** (4), 544.
- Schmaier, AH et Colman, RW** (1980). Crotalocytin: characterization of the timber rattlesnake platelet activating protein. *Blood*, **56** 1020.
- Seebeck, T et Gehr, P** (1983). Trypanocidal action of neuroleptic phenothiazines in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **9**, 197.
- Silva, L et Nussenzweig, V** (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* alternate virulenta para o camudongo branco. *Folia Clinica de Biologia*, **20**, 121.
- Simao, M; Andrade, S; Rocha, A; Moreira, A; Ferreira, R; Olivier, W et Tostes, S** (1991). Acute fatal *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in a human immunodeficiency virus-positive hemophiliac patient. *American Journal Tropical of Medicine and Hygiene*, **45** (6), 723.
- Skarnes, RC** (1970). L-amino-acid oxidase, a bacterial system. *Nature*, **225**, 1073.

**Smith, K; Mills, A; Thornton, JM et Fairlamb, AH** (1991). Trypanothione metabolism as a target for drug design: molecular modelling of trypanothione reductase. London), 482.

**Spina-França, A; Livramento, J; Machado, L et Yasuda, N** (1988). Anticorpos a *Trypanosoma cruzi* no liquido cefalorraqueano. *Arq. Neuro-Psiquiatria*, **46** (4), 374.

**Stiles, BG; Sexton, FW et Weinstein, SA** (1991). Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon*, **29** (9), 1129.

**Stocker, K** (1990). Composition of snake venoms. In "Medical use of snake venom proteins" Stocker, K. F. ed. (CRC Press, Boca Raton), 1.

**Stocker, K** (1990). Application of snake venom proteins in the diagnosis of hemostatic disorders. In "Medical use of snake venom proteins" Stocker, K. F. ed. (CRC Press, Boca Raton), 1.

**Sturm, NR; Degrave, W; Morel, C et Simpson, I**(1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **33**, 205.

**Taibi, A; Guevera-Espinoza, A; Schöneck, R; Yahiaoui, B et Ouaisi, A** (1995). Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an lignonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Parasitology*, **111**, 581.

**Takagi, J; Sekiya, F; Kasahara, K; Inada, Y et Saito, Y** (1988). Venom from southern copperhead sanke (*Agkistrodon contortix contortrix*). II. A unique phospholipase A2 that induces platelet aggregation. *Toxicon*, **26**, 199.

**Testa, B** (1995). Drug metabolism. In "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: principles and practice" Wolff, M. E. ed. (John Wiley & Sons, Inc, New York), **1**, 129.

**Tracy, J et Vande-Waa, E** (1995). Xenobiotic metabolism. In "Biochemistry and molecular biology of parasites" Marr, J. J. a. M., M. ed. (Academic Press, London), 161.

**Travi, BL; Jaramillo, C; Montoya, J; Segura, I; Zea, A; Goncalves, A et Velez, ID** (1994). *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (leishmania) chagasi* in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **50** (5), 557.

**Urbina, J; Payares, G; Molina, J; Sanoja, C; Liendo, A; Lazard, K; Piras, M; Piras, R; Perez, N; Wincker, P et Ryley, J** (1996). Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science*, **273**, 969.

**Van Voorhis, WC et Eisen, H** (1989). F1-160: a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *The Journal of Experimental Medicine*, **169**, 641.

**Velge, P; Kusnierz, J; Ouassi, MA; Pham, BN; Marty, B et Capron, A** (1991). *Trypanosoma cruzi* infection of T lymphocytes and their destruction by antibody dependent-cell-mediated cytotoxicity. *European Journal of Immunology*, **21**, 2145.

**Verbruggen, C; De Craecker, S; Rajan, P; Jiao, XY; Borloo, M; Smith, K; Fairlamb, A et Haermers, A** (1996). Phosphonic acid and phosphonic acid tripeptides as inhibitors of glutathionylspermidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **6** (3), 253.

**Vickerman, K et Preston, TM** (1976). Comparative cell biology of kinetoplastid flagellates. En: *Biology of Kinetoplastida* (Lumsden, W. H. R. & Evans D. A., London), **1**, 1

**Vickerman, K** (1976). The diversity of the kinetoplastid flagellates. En: *Biology of Kinetoplastida* (Lumsden W.H.R. & Evans D. A., London), **1**, 36.

**Vickerman, K; Myler, P et Stuart, K** (1992). African trypanosomiasis. In "Immunology and biology of parasitic infections" Warren, K. S. ed. (Blackwell Scientific Publishers, Oxford), 179.

**Warrell, D** (1985). Tropical snake bite: clinical studies in South East Asia. *Toxicon*, **23**, 543.

**WHO** (1995). Chagas' Disease. In "Tropical Disease Research. Progress 1975-94. Highlights 1993-94" Diseases, U. W. B. W. T. i. T. ed. (World Health Organization, Geneva), 125.

**Wills, C** (1991). La sagesse des gènes. Nouvelles perspectives sur l'évolution. (Flammarion, Paris), **354**, 434.

**Wincker, P; Bosseno, MF; Britto, C; Yaksic, N; Cardoso, MA; Morel, CM et Brenière, SF** (1994). High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiology Letters*, **124**, 419.

**Zhang, ZQ; Giroud, C et Baltz, T** (1993). *Trypanosoma evansi*: *in vivo* and *in vitro* determination of trypanocide resistance profiles. *Experimental Parasitology*, **77**, 387.

**Zilberstein, D et Dwyer, DM** (1984). Antidepressants cause lethal disruption of membrane function in the human protozoan parasite *Leishmania*. *Science*, **226**, 977.

