

Etude chimique et biologique des métabolites de six plantes boliviennes à activité antiparasitaire, antibactérienne et antifongique

Bravo J.A.¹, Sauvain M.², Gimenez A.³, Muñoz V.⁴, Lavaud C.⁵

1. Departamento de Química, Universidad Mayor de San Andrés P.O. Box 303 La Paz (Bolivia) Email : jbravo@mail.megalink.com
2. Institut de Recherche pour le Développement, Faculté de Pharmacie 35, chemin des Maraîchers 31062 Toulouse Cedex 4
Email : sauvain@ns.ird.fr
3. Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés P.O. Box 20606 La Paz (Bolivia)
Email : iifb@hotmail.com
4. Instituto Boliviano de Biología de Altura, Universidad Mayor de San Andrés P.O. Box 717 La Paz (Bolivia)
Email : plantibba@megalink.com
5. Laboratoire de Pharmacognosie, UPRESA 6013, CPCBAI, Bâtiment 18 Moulin de la Housse BP 1039 51097 Reims Cedex 2,
Email : catherine.lavaud@univ-reims.fr

Mots clés : analyse spectrale, pharmacognosie, médecine traditionnelle, substance naturelle, antiparasitaire, antibactérien antifongiques, Bolivie

Introduction

La population bolivienne présente un niveau de santé qui est le plus bas d'Amérique du sud. La majorité de la population souffre de maladies parasitaires, en particulier les habitants des zones tropicales. Les diarrhées et maladies respiratoires causées par des atteintes bactériennes et fongiques affectent l'ensemble de la population bolivienne, en particulier les couches les plus défavorisées. L'étude des remèdes à base de plantes, tels qu'utilisés au sein des pharmacopées traditionnelles en Bolivie, constitue un point de départ pour la recherche de principes actifs antiparasitaires et anti-infectieux. Des plantes, issues des pharmacopées de trois ethnies, ont été sélectionnées en vue d'une étude approfondie. Deux de ces ethnies (les Tacanas et les Chacobos) se situent dans la zone tropicale, et une (les Raqaypampeños) dans la zone des vallées interandines, lieu de transition entre l'Altiplano et l'Amazonie.

Discussion

Depuis 1993, une équipe franco-bolivienne de chercheurs chimistes et biologistes s'est consacrée à la valorisation des espèces utilisées par certaines ethnies boliviennes pour leurs propriétés curatives. Ces espèces ont été choisies en tenant compte des besoins de santé de la population bolivienne qui souffre de parasitoses comme le paludisme, les leishmanioses et la maladie de Chagas. L'approche appropriée pour une telle étude consiste en la réalisation d'essais

biologiques *in vitro* et *in vivo* sur les extraits des espèces choisies et en l'isolement par guidage biologique des fractions et composés actifs. Notre batterie de tests inclut également des essais antibactériens et antifongiques, ces derniers tests consistant un complément dans le cadre d'un criblage biologique incluant les maladies les plus répandues en Bolivie comme les maladies infectieuses. Les métabolites secondaires isolés proviennent de six espèces médicinales originaires de Bolivie, à savoir, *Senecio smithioides* Cabrera (Asteraceae), *Amburana cearensis* A. C. Smith (Fabaceae), *Qualea paraensis* Ducke (Vochysiaceae), *Dunalia brachyacantha* Miers (Solanaceae), *Notholaena nivea* var. *flava* Hook (Pteridaceae) et *Cavanillesia* aff. *hylogeiton* Ulbr. (Bombacaceae). Ces espèces sont rencontrées dans la pharmacopée de trois ethnies boliviennes : les Chacobo et les Tacanas, de la région amazonienne, et les Raqaypampeños des vallées interandines de Bolivie. Du point de vue chimique, l'intérêt de cette étude est lié à l'absence ou au peu d'études chimiques et biologiques réalisées antérieurement sur ces plantes. L'étude biologique des extraits et des métabolites secondaires est présentée dans un but de valorisation des connaissances médicales rapportées pour ces espèces. La découverte de principes actifs originaux doit justifier cette démarche dite "ethnopharmacologique" (Phillipson *et al.*, 1995). En Bolivie, certaines maladies parasitaires sévissent plus ou moins sévèrement, notamment le paludisme, la leishmaniose et la maladie de Chagas (Wery 1995, Rousset 1995, Atias 1991, Gentilini 1993).

Les six plantes ont été sélectionnées à partir des résultats du criblage pharmacologique des extraits hydroéthanoliques de 300 plantes



provenant principalement des régions tropicales de Bolivie récoltées suite aux enquêtes ethnopharmacologiques (Tableau I).

La méthodologie employée dans la recherche de principes actifs se base sur l'extraction et l'isolement des composés par le biais de protocoles orientés selon les résultats obtenus lors du criblage biologique. L'isolement des principes actifs est suivi de leur élucidation structurale. Deux types d'extraction ont été utilisés, le plus couramment utilisé consiste en un épuisement classique de la plante à l'aide de solvants de polarité croissante. Le second protocole d'extraction comprend une extraction primaire hydroalcoolique ; après concentration le résidu aqueux est partagé contre le dichlorométhane. La phase organique est concentrée pour fournir un résidu qui est de nouveau partagé entre l'éther de pétrole et un mélange hydrométhanolique. Diverses techniques chromatographiques (VLC, CC, TLC, PTLC) ont permis l'isolement de dix-neuf produits. Pour l'élucidation structurale, des analyses de Rmn 1D et 2D, et des spectres de masse ont été réalisés. Les structures planes des génines ont été établies principalement d'après des expériences Hmbc, Hmqc, Xhcorr et coloc. Des expériences Noesy et Roesy ont servi à l'élucidation des stéréochimies. L'établissement des structures des parties osidiques a été fait grâce aux corrélations Cosy et Hohaha, aussi bien que à partir des spectres Roesy et Hmbc. L'analyse spectrale de produits de certaines dérivatisations ont été nécessaires comme complément à l'analyse de leurs précurseurs. Les principaux résultats obtenus sont présentés dans le Tableau II.

L'espèce *Senecio smithioides* a été étudiée pour la première fois. La caractérisation d'un seul composé de structure connue mais rapporté précédemment uniquement dans deux espèces, a conduit à l'obtention d'un principe antipaludique : le furanoérémophil-1 (10)-en-9-one (Bolhmann et al. 1997) (Figure 1, 1) qui est aussi connu sous le nom de 9-oxoeuryopsine et isolé auparavant des espèces *Euryops hebecarpus* et *S. serratifolius* (Dupres et al. 1991) avec une CI_{50} de 1,2 mg/ml sur des souches chloroquinosensibles de *Plasmodium falciparum*. Ce composé est le composant majoritaire de l'extrait éthéro-pétroléique, l'extrait manifestant une activité antipaludique proche de 1 mg/ml (CI_{50}). Ce composé semble donc être responsable de l'activité antimalarique de l'espèce. Néanmoins l'étude de la cytotoxicité du composé 1 (Figure 1) doit être réalisée afin d'évaluer son indice de sélectivité.

La coumarine (Pretsch et al 1989) (Figure 1, 2) ou 2H-1-benzopyran-2-one, majoritairement présente dans l'espèce *Amburana cearensis* semble être le principe actif sur *Plasmodium falciparum* (CI_{50} 9 mg/ml, souche chloroquinosensible) de l'extrait dichlorométhane et éthéro-pétroléique. La présence de la coumarine dans des graines des espèces du genre *Amburana* a été déjà mentionnée. Les composés phénoliques, l'amburoside A (Figure 1, 3) et l'amburoside B (Figure 1, 4) sont des composés nouveaux. Seul le composé 3 manifeste une activité antiplasmodiale semblable à celle de la coumarine (CI_{50} de 9,1 mg/ml sur une souche chloroquinosensible) et

son indice d'activité dépasse celle de l'extrait de départ. Le composé 3 (Figure 1) peut être donc considéré comme le responsable de l'activité antiplasmodiale de cet extrait. L'activité antibactérienne de la coumarine 2 (Figure 1) est intéressante (inhibition de la croissance de *Escherichia coli* et *Shigella flexneri* à 125 µg/ml). Etant donné la faible cytotoxicité de ce produit, il pourrait éventuellement être testé comme antibactérien chez l'animal dans un modèle approprié. Les indices d'activité obtenus sont en accord avec les données ethnopharmacologiques recueillies auprès des Chácobo. C'est la première étude mettant en évidence les activités antiplasmodiales, antileishmanienne et contre la maladie de Chagas de la coumarine (Figure 1, 2). Parmi les deux extraits les plus actifs de *Qualea paraensis* contre *Plasmodium falciparum*, celui obtenu à partir de l'éther de pétrole et celui au méthanol, seul le premier a été étudié et purifié. La complexité des fractions a permis l'isolement de trois produits purs minoritaires et un mélange non résolu de trois composés dont l'activité antiplasmodiale est la plus proche de celle de l'extrait brut (CI_{50} 4,2 mg/ml, souche chloroquinosensible). Les produits purs manifestent une activité antiplasmodiale, moyenne pour les composés 5 (Figure 1) (3-β-acétoxyurs-12-en-11-one, CI_{50} 9 mg/ml) et 7 (sitostérol, 6,0 mg/ml) et nulle pour le composé 6 (acétate de glut-5-en-3β-yl) (Matsunaga et al. 1988). La possibilité d'un rôle synergique entre les composés 5 et 7 peut expliquer la différence d'activité entre l'extrait brut et les composés identifiés. La 3-β-acétoxyurs-12-en-11-one (Finucane et al 1972, Bandaranayake 1980, Yagishita et al 1961) (Figure 1, 5) est pour la première fois isolée comme un produit naturel. Ce composé est décrit dans la littérature comme le dérivé acétylé hémisynthétique de la 3-β-hydroxyurs-12-en-11-one isolée des espèces *Canarium zeylanicum* et *Ilex goshiensis*.

Le travail de séparation et l'étude bioguidée des fractions de *Dunalia brachyacantha*, a permis l'obtention de deux withanolides (Raffauf et al. 1991) 8 et 9 (Figure 1) présentant une bonne activité contre les leishmanies et *Trypanosoma cruzi*. La lyse totale des parasites est obtenue à des concentrations de 25 et 10 mg/ml et la disparition de 50% de formes épimastigotes et promastigotes de *Leishmania braziliensis* à la dose de 1 mg/ml. Une activité bactéricide remarquable pour 8 et 9 (Figure 1) contre *Bacillus subtilis* à la concentration de 0,0625 mg/ml et contre *Staphylococcus aureus* à la concentration de 0,125 mg/ml est démontrée pour les deux composés. La réputation antitumorale des withanolides obligera à établir les indices de cytotoxicité de 8 et 9 (Figure 1) ; ces composés 8 et 9 apparaissent ainsi comme les premiers withanolides leishmanicides et trypanocides. Les activités mesurées sur les extraits et les composés purs contre les épimastigotes et les promastigotes sont voisines. On peut donc conclure que les withanolides 8 et 9 (Fig. 1) sont largement responsables de l'activité de l'extrait de départ.

La récolte de l'espèce *Notholaena nivea* var. *flava* chez les Raqaypampeños a été réalisée suite aux renseignements ethnobotaniques laissant supposer une activité antibactérienne. Les résultats



des criblages primaires antibactériens et antifongiques des extraits ont orienté la recherche vers l'isolement de principes actifs antifongiques. L'activité de l'extrait antifongique ont conduit à la purification de quatre flavonoïdes dont deux sont actifs. Les flavanones 12 (Figure 1) ou pinoembrine (Jung et al. 1990) et 14 (Figure 1) ou sakuranetine (Baudoin et al. 1983) manifestent une bonne activité antifongique contre *Neurospora crassa*, avec respectivement 13 et 20 mm de diamètre d'inhibition de la croissance fongique en boîte de Pétri à 0,18 mg/ml. Deux autres composés connus ont été isolés et entièrement caractérisés : la pinostrobine (Figure 1, 13) et la 2',6'-dihydro-4'-méthoxy-dihydrochalcone (Figure 1, 15). Ce travail constitue la première étude chimique bioguidée de l'espèce *Notholaena nivea* var. *flava*, aboutissant à l'isolement de deux molécules antifongiques, la pinoembrine et la sakuranetine.

L'activité antipaludique manifestée par l'extrait CH₂Cl₂ de l'espèce *Cavanillesia* aff. *hylogeiton* avec 100% d'inhibition de la parasitisme sur des souches chloroquino-sensible et -résistante, a été retrouvée dans les premiers fractionnements. De ces fractions ont été identifiés le lupeol (Figure 1, 16), le 3-O-glucosylsitostérol (19), le sitostérol (17) et la sitosténone (18). Ces composés se sont révélés inactifs. La répétition des essais biologiques sur les premières fractions actives a montré une perte totale de l'activité du certainement à une instabilité du principe actif.

Perspectives

Les composés 8 et 9 de la Figure 1 sont très intéressants en raison de leurs propriétés antichagasiques, mais des études biologiques plus approfondies sont souhaitables. L'évaluation de ces composés ainsi que celle des extraits de *D. brachyacantha* sur des tests antipaludiques devraient également être réalisées. Il serait intéressant d'approfondir l'étude de l'espèce *N. nivea* var. *flava* responsable de l'activité antifongique.

En raison de leur activité antiparasitaire, de leur abondance et leur accès facile, ces deux dernières espèces sont de bons candidats à des études complémentaires en vue du développement d'un phytomédicament, dans le cadre de projets de développement durable au niveau communautaire. Ce genre de projet est soutenu par le gouvernement bolivien et s'adresse aux groupes ethniques minoritaires, pour leur offrir la possibilité d'exploiter des espèces médicinales. Cette exploitation prend en compte l'installation d'unité pilote d'extraction et de préparation de formes galéniques simples, comme par exemple des pommades. Ainsi il est possible d'imaginer un projet de développement durable pour *D. brachyacantha* en vue de la fabrication d'un phytomédicament contre la forme cutanée de leishmaniose (*L. amazonensis*) ainsi qu'un antifongique à partir de *N. nivea* var. *flava*. Cependant, ces plantes devraient satisfaire au préalable, à des essais cliniques contrôlés selon les normes émises par le Ministère bolivien de la Santé.



Des sources du savoir aux médicaments du futur — From the sources of knowledge to the medicines of the future

Conclusions

Cette recherche multidisciplinaire regroupant l'ethnobotanique, la phytochimie et la pharmacologie et animée par des équipes franco-boliviennes a abouti à la caractérisation de cinq composés antipaludiques, deux composés leishmanicides et trypanocides, trois composés antibactériens et deux composés antifongiques. Les plantes les plus actives (*Dunalia brachyacantha* et *Notholaena nivea* var. *flava*) pourront faire l'objet d'études complémentaires en vue de leur valorisation comme phytomédicaments pour lutter contre les infections parasitaires et infectieuses endémiques en Bolivie.

Remerciements

Nous remercions G. Bourdy (IRD), S. Bergeron (IFEA), E. Garcia (UMSA) et S. Arrazola (UMSS) pour la réalisation du travail ethnobotanique; C. Petermann, P. Sigaut (U. de REIMS), C. Das et O. Laprevote (Giff sur Yvette) pour la réalisation des spectres de RMN et de masse; l'Institut de Recherche pour le Développement (anciennement ORSTOM), l'Université de Reims Champagne-Ardenne, l'Universidad Mayor de San Andrés, Le Fond National pour l'Environnement de Bolivie (FONAMA) pour leur soutien financier.

Références

- PHILLIPSON J. D., WRIGHT C. W., KIRBY G. C., WARHURST D. C. (1995) Phytochemistry of some plants used in traditional medicine for the treatment of protozoal diseases, in K. HOSTETTMANN, A. MARSTON, M. MAILLARD, M. HAMBURGER (Eds.), *Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine*, London, Oxford Press, 37: 95-135.
- WERY M. (1995) *Protozoologie Médicale*, Paris, DeBoeck Université.
- ROUSSET J. J. (1995) *Maladies Parasitaires*, Paris, Abrégés Masson.
- ATIAS A. (1991) *Parasitología Clínica*, Mexico D. F., Mediterraneo.
- GENTILINI M. (1993), *Médecine Tropicale*, Paris, Flammarion.
- BOLHMANN F., ZDERO C., GRENZ M. (1974) Natürlich vorkommende Terpen-Derivative, XXXIX, Über die Inhaltsstoffe der Gattung Euryops, *Chem Ber*, 107: 2730-2759.
- DUPRE S., GRENZ J., JAKUPOVIC J., BOLHMANN F., NIEMEYER H. M. (1991) Eremophilane, germacrene and shikimic acid derivatives from Chilean Senecio Species, *Phytochemistry*, 30: 1211-1220.
- PRETSCH E., SIMON W., SEIBL J., CLERC T. (1989) Tables of Spectral Data for Structural Determination of Organic Compounds, ¹³C-NMR, ¹H-NMR, IR, MS, UV/VIS, in W. Fresenius, J. F. K. Huber, E. Pungor, G. A. Rechnitz, W. SIMON, Th. S. WEST, *Chemical Laboratory Practice*, Berlin; Heilderberg, Springer-Verlag, H345.
- MATSUNAGA S., TANAKA R., AKAGI M. (1988) Triterpenoids from *Euphorbia maculata*, *Phytochemistry*, 27: 535-537.

FINUCANE B. W., THOMSON J. B. (1972) Triterpenoids. Part VIII. Allylic oxidation by N-Bromosuccinimide, *J Chem Soc Perkin I*, 1856-1862.

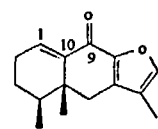
BANDARANAYAKE W. (1980) Terpenoids of *Canarium zeylanicum*, *Phytochemistry*, 19: 255-257.

YAGISHITA K., NISHIMURA M. (1961) The chemical structure of neoilexanol. I. Some properties of a new triterpenoid ketoalcohol isolated from the bark of *Ilex goshiensis* Hayata, *Agr Biol Chem*, 25; 517-518.

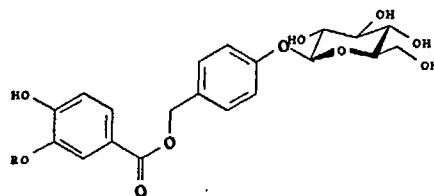
RAFFAUF R. F., SHEMLUCK M. J., LE QUESNE P. W. (1991) The withanolides of *lochroma fuchsioides*, *J Nat Prod*, 54: 1601-1606.

JUNG J. H., PUMMANGURA S., CHAICHANTIPYUTH C., PATARAPANICH C., Mc LAUGHLING. J. L. (1990) Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum*, *Phytochemistry*, 29: 1667-1670.

BAUDOIN G., TILLEQUIN F., KOCH M. (1983) Isolement, structure et synthèse de la vochysine, pyrrolidinoflavanne de *Vochysia guianensis*, *J Nat Prod*, 46, 681-687.

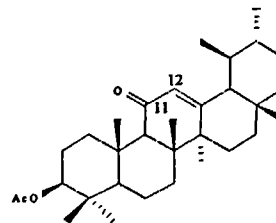


1 *furanérémosphil-1(10)-en-9-one*

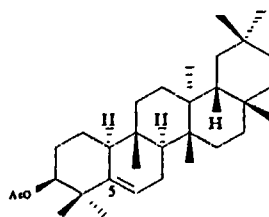


3 *amburoside A* (R=H)

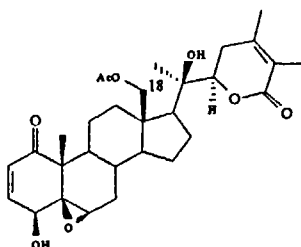
4 *amburoside B* (R=CH₃)



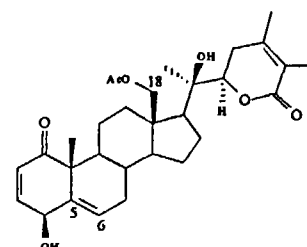
5 *3β-acétoxyurs-12-en-11-one*



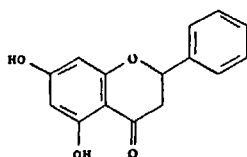
6 *acétate de gult-5-en-β-yl*



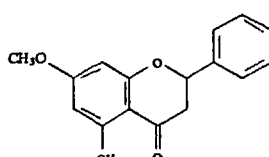
8 *18-acétoxywithanolide D*



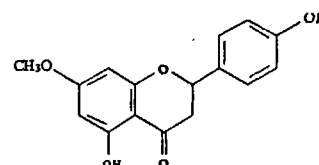
9 *18-acétoxy-5,6-déoxy-5-en-withanolide D*



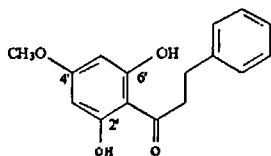
12 *pinocembrine*



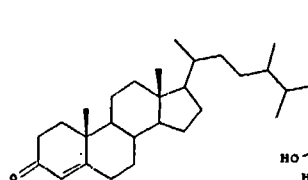
13 *pinostrobin*



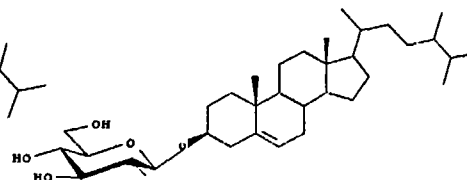
14 *sakuranetin*



15 *2',6'-dihydroxy-4'-méthoxy-dihydrochalcone*



18 *sitostenone*



19 *3-O-β-glucopyranosyl β-sitosterol*

Figure 1.

Tableau I. Résultats du criblage biologique sur les plantes sélectionnées

Plante	Extrait*	Activité	Inhibition**
<i>Amburana cearensis</i> Ecorces Chacobo	EP	antipaludique	70% à 100 µg/ml 47% à 10 µg/ml
	DM	antipaludique	96% à 100 µg/ml 63% à 10 µg/ml
	AE	antipaludique	97% à 100 µg/ml
<i>Qualea paraensis</i> Ecorces Chacobo	EP	antipaludique	CI ₅₀ < 4,2 µg/ml SCS CI ₅₀ < 12,3 µg/ml SCR
	MeOH	antipaludique	CI ₅₀ < 1,7 µg/ml SCS CI ₅₀ < 2,8 µg/ml SCR
<i>Dunalia brachyacantha</i> Feuilles Raqaypampeños	MeOH	antileishmanien antichagastique	Lyse totale des parasites à 10 µg/ml
<i>Notholoena nivea var. flava</i> Feuilles Raqaypampeños	DM	antifongique	<i>Neurospora crassa</i> à 6 µg/ml <i>Trichophyton rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>Microsporium cannis</i> à 125 µg/ml <i>Candida albicans</i> à 250 µg/ml
<i>Cavanillesia aff. hylogeiton</i> Ecorces Tacanas	EtOH	antipaludique	100% à 1 µg/ml SCS 100% à 1 µg/ml SCR
	DM	antipaludique	100% à 1 µg/ml SCS 100% à 1 µg/ml SCR
<i>Senecio smithioides</i> Feuilles Kallawayá	EP	antipaludique	CI ₅₀ < 1 µg/ml SCS

* EP : Ether de Pétrole ; DM : Dichlorométhane ; AE : Acétate d'éthyle ; MeOH : Méthanol ; EtOH : Ethanol

** SCS : Souche Chloroquinosensible ; SCR : Souche Chloroquinorésistante

Tableau II.

Plantes	Métabolites isolés (Figure 1)	Activité
<i>Amburana cearensis</i> (Fabaceae)	2. Coumarine 3. Amburoside A 4. Amburoside B	<i>Plasmodium falciparum</i> (9,0 µg/ml) <i>Escherichia coli</i> et <i>Shigella flexneri</i> (actifs à 125 µg/ml) <i>Plasmodium falciparum</i> (9,1 µg/ml) inactif
<i>Qualea paraensis</i> (Vochysiaceae)	5. 3-β-acétoxyurs-12-en-11-one 6. Acétate de gult-5-en-3β-yl 7. Sitostérol	<i>Plasmodium falciparum</i> (9,0 µg/ml, 21 µM) inactif <i>Plasmodium falciparum</i> (6,0 µg/ml, 14,5 µM)
<i>Dunalia brachyacantha</i> (Solanaceae)	8. 18-acétoxywithanolide D 9. 18-acétoxy-5,6-déoxy-5-en withanolide D 10. Dunawithanine G 11. Dunawithanine H	<i>Trypanosoma cruzi</i> (50% épimastigotes, à 50 µg/ml) <i>Leishmaniae</i> (lyse totale à 25 µg/ml) <i>Bacillus subtilis</i> ([+] à 125 µg/ml) <i>Staphylococcus aureus</i> ([+] à 62,5 µg/ml) <i>Trypanosoma cruzi</i> (lyse totale à 25 µg/ml) <i>Leishmaniae</i> (lyse totale à 10 µg/ml) <i>B. subtilis</i> ([+] à 125 µg/ml) <i>S. aureus</i> ([+] à 62,5 µg/ml) inactif inactif
<i>Notholaena nivea</i> var. <i>flava</i> (Pteridaceae)	12. Pinoembrine 13. Pinostrobine 14. Sakuranetine 15. 2',6'-dihydroxy-4'-méthoxy-dihydrochalcone	<i>Neurospora crassa</i> (13 mm d'halo d'inhibition) Inactif <i>Neurospora crassa</i> (13 mm d'halo d'inhibition) inactif
<i>Cavanillesia</i> aff. <i>Hylogeiton</i> (Bombacaceae)	16. Lupéol 17. Sitostérol 18. Sitosténone 19. 3-O-β-D-glucopyranosil β-sitosterol	inactif inactif non testé inactif
<i>Senecio smithioides</i> (Asteraceae)	1. Furanémophil-1(10)-en-9-one	<i>Plasmodium falciparum</i> (1,2 µg/ml, 5,3 µM)