



**UNIVERSITÉ
DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE**

UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE PHARMACIE

ANNÉE 1999

N°

THÈSE

présentée en vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE**

MENTION : PHARMACIE

Spécialité : Pharmacognosie

soutenue publiquement à Reims le 24 Septembre 1999

par José-Antonio BRAVO-BARRERA

**"ÉTUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES MÉTABOLITES DE SIX PLANTES
BOLIVIENNES À ACTIVITÉ ANTIPARASITAIRE, ANTIBACTÉRIENNE ET
ANTIFONGIQUE"**

JURY

**Pr. Monique ZECHES-HANROT
Pr. Joseph D. CONNOLLY
Dr. Georges MASSIOT
Dr. Mireille HONTEBEYRIE
Dr. Michel SAUVAIN
Dr. Alberto GIMENEZ
Pr. Catherine LAVAUD**

**Président
Rapporteur
Rapporteur**

Directeur

Université de Reims Champagne-Ardenne

UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE PHARMACIE

ANNÉE 1999

N°

THÈSE

présentée en vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE**

MENTION : PHARMACIE

Spécialité : Pharmacognosie

soutenue publiquement à Reims le 24 Septembre 1999

par José-Antonio BRAVO-BARRERA

**“ÉTUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES MÉTABOLITES DE SIX PLANTES
BOLIVIENNES À ACTIVITÉ ANTIPARASITAIRE, ANTIBACTÉRIENNE ET
ANTIFONGIQUE”**

JURY

Pr. Monique ZECHES-HANROT
Pr. Joseph CONNOLLY
Dr. Georges MASSIOT
Dr. Mireille HONTEBEYRIE
Dr. Michel SAUVAIN
Dr. Alberto GIMENEZ
Pr. Catherine LAVAUD

Président
Rapporteur
Rapporteur

Directeur

A Madame Monique ZECHES-HANROT

Professeur de Pharmacognosie, Directeur du Laboratoire de Pharmacognosie
à la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

A Monsieur Joseph D. CONNOLLY

Professeur de Chimie Organique au Département de Chimie
de l'Université de Glasgow-Ecosse

A Monsieur Georges MASSIOT

Directeur de Recherches au Centre National de la
Recherche Scientifique. Directeur du Centre de Recherches sur les Substances Naturelles de
l'Institut Pierre Fabre

A Madame Mireille HONTEBEYRIE

Directeur du Laboratoire d'Immunopathogénèse à l'Institut Pasteur de Paris.
Chargé de mission à la Direction Scientifique de l'Institut Pasteur

A Monsieur Michel SAUVAIN

Chargé de Recherches à l'Institut de la Recherche
pour le Développement. Responsable du Groupe de Recherche sur les Substances Naturelles

A Monsieur Alberto GIMENEZ

Professeur de Chimie des Substances Naturelles
Directeur de l'Institut des Recherches Pharmaco Biochimiques (IIFB)
de l'Université Majeure de San Andrés, La Paz-Bolivie

A Mademoiselle Catherine LAVAUD

Professeur de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

qui ont accepté de juger ce travail

En témoignage de ma respectueuse gratitude

A Mademoiselle Catherine Lavaud

Qui m'a accepté au sein du laboratoire de pharmacognosie et qui m'a formé à la recherche, dans le domaine de la chimie de substances naturelles. Son extraordinaire dévouement aussi bien au cours de mon stage de DEA, qu'elle a également dirigé, ainsi qu'au cours de ma thèse, m'a permis d'accéder non seulement aux techniques de RMN mais aussi à une approche enthousiaste de la recherche.

Ses qualités humaines ont été un soutien indispensable pour moi-même ainsi que pour ma petite famille, lors de nos nombreux séjours à Reims.

En témoignage de ma profonde gratitude

A Monsieur Michel Sauvain

Avec qui nous avons partagé toutes ces années de travail pour achever nos rêves et réussir ces travaux. Son soutien moral et matériel à travers l'IRD (anciennement l'ORSTOM) m'a permis de me déplacer plusieurs fois en France dans le cadre de cette thèse. Son enthousiasme m'a soutenu et conforté depuis l'époque de ses démarches pour l'obtention d'une bourse du gouvernement Français pour faire mon DEA à Reims jusqu'à ce jour. Sa grande compétence dans le domaine de la chimiothérapie antiparasitaire m'a aidé énormément dans la réalisation de ce travail.

En témoignage de ma profonde gratitude

A Madame le Professeur Louisette Le Men-Olivier

Professeur de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie de Reims

Pour m'avoir accueilli dans le laboratoire de Pharmacognosie de Reims pendant mon DEA et pendant cette thèse, tout en manifestant toujours un vif intérêt et en m'encourageant dans les moments les plus difficiles.

En témoignage de ma grande et respectueuse considération

A Monsieur le Docteur Georges Massiot

Ancien Directeur de l'UPRESA 6013 au CNRS de Reims

Pour avoir suivi avec beaucoup d'intérêt ce travail et pour son soutien aux liens de coopération scientifique entre la France et la Bolivie.

En témoignage de ma profonde gratitude

A Monsieur le Professeur Jean Levy

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Reims

Pour m'avoir accueilli au sein de la Faculté pour la réalisation du DEA et de cette thèse

En témoignage de ma reconnaissance

A Madame le Professeur Monique Zeches-Hanrot

Directeur du laboratoire de Pharmacognosie de Reims

Pour m'avoir accueilli dans le laboratoire de Pharmacognosie de Reims,

En témoignage de ma sincère reconnaissance

A Monsieur le Docteur Jean-Marc Nuzillard

Directeur de l'UPRESA 6013 au CNRS de Reims

En témoignage de ma reconnaissance

A Monsieur le Docteur Christian Moretti

Ancien Directeur de l'UR 7Substances Naturelles d'Intérêt Biologique de l'IRD (anciennement l'ORSTOM) et Directeur du Département de Pharmacognosie de l'IBBA

Pour m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche pendant la réalisation de mon DEA, pour le soutien et l'encouragement pendant la réalisation de cette thèse

En témoignage de ma profonde et respectueuse gratitude

A Madame le docteur Geneviève Bourdy
Chargé de Recherches de l'UR 7Substances Naturelles d'Intêret Biologique de
l'IRD (anciennement l'ORSTOM) au Département de Pharmacognosie de l'IBBA
Pour son amitié et ces encouragements, et sa participation active dans le domaine de
l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie
En témoignage de ma profonde reconnaissance

A Monsieur le Docteur Eric Deharo
Chargé de Recherches de l'UR 7Substances Naturelles d'Intêret Biologique de
l'IRD (anciennement l'ORSTOM) au Département de Pharmacognosie de l'IBBA
Pour son amitié et toute sa coopération dans toutes les périodes françaises ou
boliviennes pendant lesquelles il m'a témoigné son soutien fraternel.
En témoignage de ma sincère amitié

A Monsieur le Professeur Enrique Vargas
Directeur de l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude, IBBA de l'Université
Majeure de San Andrés à La Paz
Pour m'avoir accueilli au sein de son Institut au Département de Pharmacognosie
En témoignage de ma profonde et respectueuse gratitude

A Madame le Docteur Mireille Hontebeyrie
Ancien co-Directeur de l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude, IBBA de
l'Université Majeure de San Andrés à La Paz
Pour m'avoir accueilli au sein de son Institut au Département de Pharmacognosie
En témoignage de ma profondegratitude

Je voudrais adresser mes remerciements

A Monsieur le Professeur Leonardo Guzmán
Directeur du Département de Chimie de l'Université Majeure de San Andrés à La
Paz

A Monsieur le Professeur Carlos Santelices
Ancien Directeur du Département de Chimie de l'Université Majeure de San Andrés
à La Paz

A Monsieur le Professeur Rómulo Gemio
Ancien Directeur du Département de Chimie de l'Université Majeure de San Andrés
à La Paz

A Monsieur le Professeur Pedro Crespo
Directeur de l'Institut de Recherche en Chimie, IIQ de l'Université Majeure de San
Andrés à La Paz

A Madame le Professeur Luisa Balderrama
Ancien Directeur de l'Institut de Recherche en Chimie, IIQ de l'Université Majeure
de San Andrés à La Paz

A Madame le Professeur Marie-Joseph Hoizey
Professeur de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie de Reims
pour ses encouragements et sa précieuse amitié ainsi que celle de sa famille.

A Monsieur le Docteur Frédéric Bonté
Directeur de Recherche à LVMH
Pour m'avoir donné son amitié et confiance en m'aidant financièrement par une
bourse de recherche de court séjour.

A Monsieur le Docteur Bernard Weniger
Chargé de Recherches à Cali, IRD Colombie
Pour m'avoir fourni un précieux matériel bibliographique pour cette recherche.

Je tiens également à remercier toutes les personnes et institutions qui à divers titres ont coopéré à la
réalisation de cette thèse.

Madame le Docteur Catherine Caron

Mademoiselle Marie-José Jacquier

Monsieur Philippe Thepenier

Monsieur Christian Petermann

Monsieur Philippe Sigaut

Monsieur Bernard Richard

Madame Patricia Demorgny

Monsieur le Docteur Christophe Bliard

Madame le Docteur Karen Plé

Madame le Docteur Catherine Joly

Monsieur le Docteur Jean-Hugues Renault

Madame le Docteur Anne-Claire Mitaine

Mademoiselle le Docteur Laurence Voutquenne

Monsieur le Docteur Khaled Mesbah

Monsieur le Docteur Stéphane Bourg

Mademoiselle Gaëlle Le Crouerour

Monsieur Jérôme Deville

Du laboratoire de Pharmacognosie de Reims, qui m'ont témoigné leur aide et leur gentillesse lors de
mes séjours rémois

Madame la Lic. Victoria Muñoz

Madame la Lic. Elfride Balanza

Madame la Lic. Jorgia Callapa

Madame Grace Ruiz

Madame la Lic. Ivon Rojas

Madame la Lic. Patricia Mollinedo

Monsieur Fernando Vargas

pour avoir réalisé les essais antiparasitaires à l'IBBA, pour leur grande amitié et leurs encouragements tout au long de ce travail

Madame Patricia Velasco

Mademoiselle la Lic. Esther Flores

Madame la Lic. Maria Miranda

pour avoir participé à la réalisation des essais antibactériens et antifongiques à l'IIFB

Monsieur Stéphane Ayangma

pour sa collaboration personnelle et matérielle à la rédaction de ce travail

A mes amis et mes collègues des laboratoires de recherche à l'IIQ,
pour leur amitié et leurs encouragements permanents

Aux chercheurs botanistes de l'UMSA, l'UMSS, l'IRD et l'IFEA dont particulièrement les docteurs Geneviève Bourdy et Syylvie Bergeron, et la lic. Susana Arrazola qui ont participé à ce travail

Aux membres originaires des ethnies boliviennes Chácobo, Raqaypampeños et Tacanas
pour leur disponibilité et coopération

A l'Institut de la Recherche pour le Développement (anciennement ORSTOM)

A l'Université de Reims Champagne-Ardenne

A l'Université Majeure de San Andrés

Au Fond National pour l'Environnement FONAMA de Bolivie

pour leur soutien financier

En témoignage de ma profonde reconnaissance

A Monsieur et Madame André Kestel et à l'assemblée du Centre Évangélique de Reims
Pour leur chalereuse et fraterne amitié tout au long de ces années de thèse

A la famille Gauron de Reims
Pour leur chalereuse et fraterne amitié

A Monsieur et Madame Juan Antonio Maldonado et à l'assemblée Évangélique El Jireh à
La Paz
Pour leur chalereuse et fraterne amitié tout au long de ces années de thèse

Esta tesis esta dedicada a mi esposa Lizy y mis hijos Andresito y Sarita-Marianne,
por todo el amor que siempre supieron prodigarme por el cual agradezco a Dios, por su paciencia y
animo continuos en cada instante de trabajo en especial durante las separaciones familiares.

También dedico esta tesis a mis padres, Jaime y Gladys por su gran amor, dedicación y
cuidado, y su apoyo material y afectivo incondicional, y a mi hermano Jaime Alfredo y su familia
por su amor fraternal y su compañerismo

Un agradecimiento especial a mis otros papás y hermano, Juvenal, Arminda y Jorge, por su amor y
su preocupación permanentes

Este esfuerzo fue siempre bien recompensado por el recuerdo de mis abuelos paternos, Raul
y Rosita, y maternos Alfredo y Elena a cuya memoria dedico esta frase.

"La crainte de l'Eternel est le commencement de la science"

Roi Salomon

SOMMAIRE

GLOSSAIRE.....	5
INTRODUCTION.....	7
I. PREMIÈRE PARTIE: APERÇUS ETHNIQUE, ÉTIOLOGIQUE ET ÉPIDÉMIOLOGIQUE EN BOLIVIE.....	9
I.1. ENCADREMENT GÉOSOCIOÉCONOMIQUE ET BIODIVERSITÉ ETHNIQUE.....	10
I.1.1. <i>Problèmes de santé publique.....</i>	12
I.1.2. <i>Les Chácobos.....</i>	14
I.1.3. <i>Les Raqaypampenos</i>	15
I.1.4. <i>Les Tacanas</i>	17
I.2. LES GRANDS PROBLÈMES D'ORIGINE PARASITAIRE EN BOLIVIE	20
I.2.1. <i>Le paludisme.....</i>	20
I.2.1.1. Définition.....	20
I.2.1.2. Épidémiologie.....	20
I.2.1.3. Chimiothérapie	22
I.2.2. <i>La leishmaniose.....</i>	27
I.2.2.1. Définition.....	27
I.2.2.2. Épidémiologie.....	28
I.2.2.3. Chimiothérapie	28
I.2.3. <i>La maladie de Chagas.....</i>	31
I.2.3.1. Définition.....	31
I.2.3.2. Épidémiologie.....	31
I.2.3.3. Chimiothérapie	32
I.3. LES MALADIES D'ORIGINE BACTÉRIENNE ET FONGIQUE.....	34
I.3.1. <i>Chimiothérapie antibactérienne.....</i>	34
I.3.2. <i>Chimiothérapie antifongique</i>	38
II. DEUXIÈME PARTIE: BOTANIQUE, ETHNOPHARMACOLOGIE, EXTRACTION DES ESPÈCES ÉTUDIÉES.....	41
II.1. INTRODUCTION.....	42
II.2. SENECIO SMITHIODES, CABRERA (ASTERACEAE).....	45
II.2.1. <i>Présentation botanique et ethnopharmacologique</i>	46
II.2.2. <i>Extraction.....</i>	46
II.3. AMBURANA CEARENSIS, A. C. SMITH (FABACEAE).....	49
II.3.1. <i>Présentation botanique et ethnopharmacologique</i>	49
II.3.2. <i>Extraction.....</i>	50
II.4. QUALEA PARAENSIS, DUCKE (VOCHYSIACEAE).....	53
II.4.1. <i>Présentation botanique et ethnopharmacologique</i>	54
II.4.2. <i>Extraction.....</i>	54
II.5. DUNALIA BRACHYACANTHA, MIERS (SOLANACEAE).....	57
II.5.1. <i>Présentation botanique et ethnopharmacologique</i>	58
II.5.2. <i>Extraction.....</i>	58
II.6. NOTHOLAENA NIVEA VAR. FLAVA, HOOK (PTERIDACEAE).....	61
II.6.1. <i>Présentation botanique et ethnopharmacologique</i>	62
II.6.2. <i>Extraction.....</i>	62
II.7. CAVANILLESIA AFF. HYLOGEITON, ULBR. (BOMBACACEAE).....	65
II.7.1. <i>Présentation botanique et ethnopharmacologique</i>	66
II.7.2. <i>Extraction.....</i>	66

III. TROISIÈME PARTIE: PURIFICATION BIOGUIDÉE DES COMPOSÉS ACTIFS DES ESPÈCES ÉTUDIÉES..... 68

III.1.	INTRODUCTION.....	69
III.2.	SENECIO SMITHIODES	69
III.2.1.	<i>Etude bibliographique du genre Senecio</i>	69
III.2.2.	<i>Purification bioguidée de l'extrait éthéro-pétroléique</i>	71
III.3.	AMBURANA CEARENSIS (FABACEAE).....	74
III.3.1.	<i>Purification bioguidée des extraits</i>	74
III.3.1.1.	Extrait éthéro-pétroléique.....	74
III.3.1.2.	Extrait au dichlorométhane	75
III.3.1.3.	Extrait à l'acétate d'éthyle.....	76
III.4.	QUALEA PARAENSIS.....	79
III.4.1.	<i>Etude bibliographique du genre Qualea</i>	79
III.4.2.	<i>Purification bioguidée des extraits</i>	79
III.4.2.1.	Extrait méthanolique.....	79
III.4.2.2.	Extrait éthéro-pétroléique.....	81
III.5.	DUNALIA BRACHYACANTHA (SOLANACEAE).....	84
III.5.1.	<i>Etude bibliographique du genre Dunalia</i>	84
III.5.2.	<i>Purification bioguidée des extraits</i>	90
III.5.2.1.	Extrait éther de pétrole du premier lot (I).....	90
III.5.2.2.	Extrait méthanolique du premier lot (I)	91
III.5.2.3.	Extrait méthanolique du deuxième lot (II)	92
III.5.2.4.	Extrait hydroéthanolique des racines (2 ^e lot)	97
III.5.3.	<i>Conclusion</i>	97
III.6.	NOTHOLAENA NIVEA VAR. FLAVA (PTERIDACEAE).....	99
III.6.1.	<i>Etude bibliographique du genre Notholaena</i>	99
III.6.2.	<i>Purification bioguidée de l'extrait actif</i>	100
III.6.3.	<i>Conclusion</i>	103
III.7.	CAVANILLESIA AFF. HYLOGEITON (BOMBACACEAE).....	104
III.7.1.	<i>Etude bibliographique du genre Cavanillesia</i>	104
III.7.2.	<i>Purification bioguidée de l'extrait actif</i>	104

IV. QUATRIÈME PARTIE: DÉTERMINATION DE STRUCTURE..... 109

IV.1.	INTRODUCTION.....	110
IV.2.	GÉNÉRALITÉS - CHIMIE STRUCTURALE.....	110
IV.2.1.	<i>Méthodologie de RMN</i>	110
IV.2.1.1.	Corrélation scalaire: spectroscopie COSY (CORrelated SpectroscopY).....	111
IV.2.1.2.	Corrélation totale: spectroscopie HOHAHA (HOMonuclear HARTmann-HAHn).....	112
IV.2.1.3.	Corrélation vectorielle: spectroscopies NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) et ROESY (Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY)	113
IV.2.1.4.	Corrélation hétéronucléaire directe: spectroscopies XHCORR (XH CORRelated spectroscopy) et HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), et distante: COLOC (CORrelation by LONG range Coupling) et HMBC (Heteronuclear Multiple-Bound Correlation)	115
IV.2.1.5.	Expériences hétéronucléaires monodimensionnelles, JMOD (J-MODulated spin-echo experiment) et DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)	117
IV.2.2.	<i>Spectrométrie de masse</i>	118
IV.3.	DÉTERMINATION DE STRUCTURE DU COMPOSÉ 1 DE SENECIO SMITHIODES.....	122
IV.3.1.	<i>Analyse du spectre RMN ¹H du composé 1</i>	122
IV.3.2.	<i>Analyse du spectre RMN ¹³C du composé 1</i>	124
IV.4.	DÉTERMINATION DE STRUCTURE DES COMPOSÉS D'AMBURANA CEARENSIS	131
IV.4.1.	<i>Composé 2</i>	131
IV.4.1.1.	Analyse du spectre RMN ¹ H	131
IV.4.1.2.	Analyse du spectre RMN ¹³ C	132
IV.4.2.	<i>Composé 3</i>	135
IV.4.2.1.	Analyse des spectres de RMN ¹ H et COSY.....	136

IV.4.2.2.	Analyse des spectres RMN ¹³ C et XHCORR	139
IV.4.2.3.	Analyse des spectres COLOC et NOESY	142
IV.4.3.	<i>Composé 4</i>	147
IV.4.3.1.	Analyse des spectres de RMN.....	148
IV.5.	DÉTERMINATION DE STRUCTURE DES COMPOSÉS DE <i>QUALEA PARAENSIS</i>	153
IV.5.1.	<i>Composé 5</i>	153
IV.5.1.1.	Analyse des spectres de RMN.....	153
IV.5.1.2.	Analyse du spectre de masse d'impact électronique.....	157
IV.5.2.	<i>Composé 6</i>	159
IV.5.2.1.	Analyse du spectre RMN ¹ H.....	159
IV.5.2.2.	Analyse du spectre RMN ¹³ C.....	160
IV.5.2.3.	Analyse des spectres COSY, XHCORR et HMBC.....	160
IV.5.2.4.	Analyse du spectre de masse d'impact électronique.....	163
IV.5.3.	<i>Détermination de structure du composé 7</i>	164
IV.6.	DÉTERMINATION DE STRUCTURE DES COMPOSÉS DE <i>DUNALIA BRACHYACANTHA</i>	166
IV.6.1.	<i>Détermination de structure des composés 8 et 9</i>	166
IV.6.1.1.	Analyse des spectres de RMN.....	167
IV.6.1.2.	Analyse des spectres de masse.....	175
IV.6.2.	<i>Détermination de structure des composés 10 et 11</i>	179
IV.6.2.1.	Structure de la génine.....	180
IV.6.2.1.1.	Structure plane.....	181
IV.6.2.1.2.	Stéréochimie.....	184
IV.6.2.1.3.	Structure de la chaîne diosidique de 10	185
IV.6.2.1.4.	Structure de la chaîne triosidique de 11	190
IV.6.2.2.	Analyse des spectres de masse.....	193
IV.6.2.2.1.	FAB et LSIMS.....	193
IV.6.2.2.2.	Spectres de masse en tandem.....	196
IV.6.2.3.	Conclusion.....	201
IV.7.	DÉTERMINATION DE STRUCTURE DES COMPOSÉS DE <i>NOTHOLAENA NIVEA</i> VAR. <i>FLAVA</i>	205
IV.7.1.	<i>Composés 12, 13 et 14</i>	205
IV.7.1.1.	Analyse des spectres de RMN.....	205
IV.7.1.2.	Analyse des spectres de masse d'impact électronique.....	209
IV.7.2.	<i>Composé 15</i>	212
IV.7.2.1.	Analyse du spectre de masse d'impact électronique.....	212
IV.7.2.2.	Analyse des spectres de RMN.....	213
IV.8.	DÉTERMINATION DE STRUCTURE DES COMPOSÉS DE <i>CAVANILLESIA</i> AFF. <i>HYLOGEITON</i>	216
IV.8.1.	<i>Composés 16, 17, 18 et 19</i>	216
V.	CINQUIÈME PARTIE: CONCLUSION	225
VI.	SIXIÈME PARTIE: DONNÉES EXPÉRIMENTALES	234
VI.1.	GÉNÉRALITÉS.....	235
VI.1.1.	<i>Appareillage</i>	235
VI.1.2.	<i>Supports chromatographiques</i>	235
VI.2.	EXTRACTION ET PURIFICATION DES COMPOSÉS	236
VI.2.1.	<i>Extraction et purification du composé 1 de Senecio smithioides</i>	236
VI.2.2.	<i>Extraction et purification des composés 2, 3 et 4 de Amburana cearensis</i>	236
VI.2.3.	<i>Extraction et purification des composés 5, 6 et 7 de Qualea paraensis</i>	238
VI.2.4.	<i>Extraction et purification des composés 8, 9, 10 et 11 de Dunalia brachyacantha</i>	239
VI.2.5.	<i>Extraction et purification des composés 12, 13, 14 et 15 de Notholaena nivea var. flava</i>	243
VI.2.6.	<i>Extraction et purification des composés 16, 17, 18 et 19 (Cavanillesia aff. hylogeiton)</i>	246
VI.3.	ACÉTYLATION DES WITHANOLIDES	250
VI.4.	CARACTÉRISTIQUES DES COMPOSÉS.....	251
VI.4.1.	<i>Composé 1, ou furanérémophil-1(10)-en-9-one, de Senecio smithioides</i>	251
VI.4.2.	<i>Composés 2, 3 et 4 de Amburana cearensis</i>	251
VI.4.2.1.	<i>Coumarine 2</i>	251

VI.4.2.2.	Amburoside A 3.....	252
VI.4.2.3.	Amburoside B 4.....	253
VI.4.3.	Composés 5, 6 et 7 de <i>Qualea paraensis</i>	253
VI.4.3.1.	3 β -acétoxyurs-12-en-11-one 5	253
VI.4.3.2.	Acétate de glut-5-en-3 β -yl 6.....	254
VI.4.3.3.	β -sitostérol 7 (= composé 17)	254
VI.4.4.	Composés 8, 9, 10, 10a, 11 et 11a, de <i>Dunalia brachyacantha</i>	255
VI.4.4.1.	18-acétoxywithanolide D 8.....	255
VI.4.4.2.	18-acétoxy-5,6-déoxy-5,6-déihydro-withanolide D 9	256
VI.4.4.3.	Dunawithanine G 10.....	257
VI.4.4.4.	Dérivé peracétylé de la dunawithanine G 10a.....	258
VI.4.4.5.	Dunawithanine H 11.....	258
VI.4.4.6.	Dérivé peracétylé de la dunawithanine H 11a.....	259
VI.4.5.	Caractéristiques des composés 12, 13, 14, et 15 de <i>Notholaena nivea</i> var. <i>flava</i>	260
VI.4.6.	Pinocembrine 12.....	260
VI.4.6.1.	Pinostrobin 13.....	261
VI.4.6.2.	Sakuranetine 14,.....	261
VI.4.6.3.	2,6-dihydroxy-4-méthoxy-dihydrochalcone 15	262
VI.4.7.	Caractéristiques des composés 16, 18 et 19 de <i>Cavanillesia</i> aff. <i>hylogeiton</i>	262
VI.4.7.1.	Lupéol 16.....	262
VI.4.7.2.	β -sitosténone 18.....	263
VI.4.7.3.	3-O- β -D-glucopyranosyl β sitostérol 19.....	264
VI.5.	PROTOCOLES DES ESSAIS BIOLOGIQUES.....	264
VI.5.1.	Essais antipaludiques	264
VI.5.2.	Essais leishmanicides et trypanocides.....	265
VI.5.3.	Essais antibactériens.....	266
VI.5.4.	Essais antifongiques	266

BIBLIOGRAPHIE.....	268
--------------------	-----

GLOSSAIRE

AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
$[\alpha]_D$	pouvoir rotatoire
A.s.	<i>Artemia salina</i>
ax	axial, axiale
B.s.	<i>Bacillus subtilis</i>
C.a.	<i>Candida albicans</i>
CC	Chromatographie en colonne ouverte
CCM	Chromatographie sur couche mince
CCMP	Chromatographie en colonne à moyenne pression
CPP	Chromatographie sur plaque préparative
CD	Couplage direct
CE ₅₀	Concentration effective 50
CI ₅₀	Concentration inhibitrice 50
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CD ₃ OD	Méthanol deutéré
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
COLOC	Correlation by long range coupling
COSY	Correlated spectroscopy
δ	déplacement chimique
d	Doublet
dd	Doublet de doublets
ddd	Doublet de doublets de doublets
dl	Doublet large
ddl	Doublet de doublets large
dm	Doublet de multiplets
dqd	Doublet de quadruplets de doublets
dt	Doublet de triplets
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfert
eq	equatorial, équatoriale
E.c.	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
EP	Ether de pétrole
FAB	Fast atom bombardement
Hex	Hexane
HMBC	Heteronuclear multiple-bound correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation transfert
HOHAHA	Homonuclear Hartmann-Hahn
IR	Infra-rouge
IS	Indice de sélectivité
J	Constante de couplage
JMOD	J-modulated spin-echo experiment
L.	<i>Leishmania</i>
L.a.	<i>Leishmania amazonensis</i>
L.b.	<i>Leishmania braziliensis</i>
L.d.	<i>Leishmania donovani</i>
LSIMS	Liquid secondary ionisation mass spectrometry
m	meta
m	Multiplet
ml	Multiplet large
Me	Méthyle
MeO	Méthoxyle

MeOH	Méthanol
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
<i>N.c.</i>	<i>Neurospora crassa</i>
nOe, NOE	Nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
o	ortho
p	para
<i>P.f.</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
pf	Point de fusion
ppm	partie par million
<i>q</i>	Quadruplet
<i>qd</i>	Quadruplet de doublets
RMN 1D	Résonance magnétique nucléaire monodimensionnelle
RMN 2D	Résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle
RMN ¹³ C	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
RMN ¹ H	Résonance magnétique nucléaire du proton
rOe, ROE	Rotating frame Overhauser effect
ROESY	Rotating frame Overhauser effect spectroscopy
<i>s</i>	Singulet
<i>sl</i>	Singulet large
<i>S.a.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
scr	Souche chloroquino-résistante
scs	Souche chloroquino-sensible
smr	Souche multiple-drogue résistante
<i>S.f.</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SiO ₂	Gel de silice
SM-IE	Spectrométrie de masse sous impact électronique
[θ]	ellipticité moléculaire
<i>t</i>	Triplet
<i>td</i>	Triplet de doublets
<i>tl</i>	Triplet large
<i>tm</i>	Triplet de multiplets
<i>T.c.</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
μ M	micromolaire
UV	Ultraviolet
VLC	Vacuum liquid chromatography
XHCORR	XH-correlated spectroscopy

INTRODUCTION

En Amérique Latine, et particulièrement en Bolivie, les groupes ethniques possèdent une connaissance fine de l'environnement. Cette connaissance est encore transmise de nos jours et dans certains cas avec peu d'influence occidentale. Le domaine le plus aisément valorisable correspond à la connaissance des plantes à propriétés médicinales. Ainsi, certaines espèces réputées efficaces pour le traitement de maladies locales communes, méritent une étude approfondie.

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 consistant en un complément dans le cadre d'un criblage biologique qui se veut être en accord avec les maladies les plus répandues en Bolivie comme les maladies infectieuses. Ce travail de thèse fait partie de ce programme de recherche.

L'objectif de ce travail est défini comme l'extraction, la purification, l'isolement et la détermination structurale de métabolites secondaires, et l'évaluation de leurs activités biologiques par des tests antiparasitaires, antibactériens et antifongiques. Ces métabolites proviennent de six espèces médicinales originaires de Bolivie, à savoir, *Senecio smithioides* (Asteraceae), *Amburana cearensis* (Fabaceae), *Qualea paraensis* (Vochysiaceae), *Dunalia brachyacantha* (Solanaceae), *Notholaena nivea* var. *flava* (Pteridaceae) et *Cavanillesia* aff. *hylogeiton* (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 se base sur l'absence ou la faible quantité d'études chimiques et biologiques réalisées antérieurement sur certaines de 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".

Le plan suivi dans cette thèse comprend quatre parties. En premier lieu une révision des indices de développement et de santé en Bolivie justifiant l'étude de plantes antiparasitaires et anti-infectieuses suivie d'une brève étude étiologique et épidémiologique des maladies dans la population bolivienne

pour lesquelles les groupes ethniques proposent des traitements traditionnels. Ensuite l'étude approfondie des six espèces est réalisée; cette étude est basée sur les résultats initiaux du criblage biologique de plantes sélectionnées par une recherche ethnobotanique et ethnopharmacologique chez les ethnies. Dans cette deuxième partie est abordée l'extraction des six espèces actives et l'établissement des indices d'activité des extraits. La troisième partie concerne la séparation et la purification des extraits conduisant normalement à l'obtention de composés purs; les étapes de purification sont guidées par des essais biologiques. Dans la quatrième partie nous aborderons la détermination structurale des composés actifs réalisée à travers des méthodes spectroscopiques. Cette analyse structurale se base fondamentalement sur l'utilisation de la Résonance Magnétique Nucléaire et la spectrométrie de masse; elle constitue la partie la plus importante de ce travail.

I. PREMIÈRE PARTIE

APERÇUS ETHNIQUE, ÉTIOLOGIQUE ET ÉPIDÉMIOLOGIQUE EN BOLIVIE

1.1. Encadrement géosocioéconomique^{1,2,3} et biodiversité ethnique

Pays sud-américain du cône sud, la Bolivie est bordée au nord et nord-est par le Brésil, au sud-est par le Paraguay, au sud par l'Argentine, au sud-ouest par le Chili et à l'ouest par le Pérou. Sa population est estimée en 1998 à 8 millions d'habitants qui occupent un territoire de 1.098.581 km², représentant la densité démographique la plus basse de l'Amérique du sud, soit 6,74 habitants/km² (superficie cultivée = 2,6%). La croissance démographique est estimée à 2,11% et la croissance moyenne du PIB à 3,68%. Le revenu annuel moyen par personne est de 4.920 FF. L'indice d'analphabétisme est de 20%.

La majorité de la population est indigène et se répartit dans les groupes ethniques: aymara (22%) et quechua (34%), qui possèdent un très fort héritage culturel de par leur ancêtres Incas, et qui occupent les hauts plateaux et les vallées interandines dans la région occidentale du pays. De nombreuses ethnies minoritaires représentent 1,5% de la population nationale, et occupent les plateaux amazoniens du nord-est, la région orientale et celle du sud-ouest dite du Chaco (Figure 1). Ces groupes ont gardé leur propre culture recevant peu d'influence culturelle aymara, quechua ou occidentale durant les époques pré-coloniale, coloniale et républicaine jusqu'au début des années 50. La population d'origine européenne est minoritaire (20%). Le restant de la population est constitué de métisses et représente une classe émergente importante.

Selon le dernier recensement indigène,⁴ 35 groupes ethniques existent en Amazonie, l'Orient et le Chaco boliviens. Par département (Figure 1) et par importance d'après le nombre de membres, ces groupes peuvent se classer ainsi:

- Département du Béni (Amazonie bolivienne): Mojeño, Movima, Chimane, Itonoma, Tacana, Yuracaré, Cavineño, Mosetén, Cayuvaba, Chácobo, Baure, Canichama, Moré ou Iténez et Pacahuara.
- Département de Santa Cruz (orient et Chaco boliviens): Chiquitano, Guaraní, Guarayo, Ayoreo et Siriono.
- Département de La Paz (au nord du département correspondant à l'Amazonie bolivienne): Tacana, Moseten, Leco et Araona.
- Département de Tarija (Chaco bolivien): Ava Guaraní, Weenhayek et Tapiete.
- Département de Cochabamba (partiellement à l'orient et partiellement dans la partie amazonienne bolivienne): Yuracaré, Mojeño et Yuki.
- Département de Pando (Amazonie bolivienne): Esse Ejja, et Yaminagua.
- Département de Chuquisaca (Chaco bolivien): Guaraní.

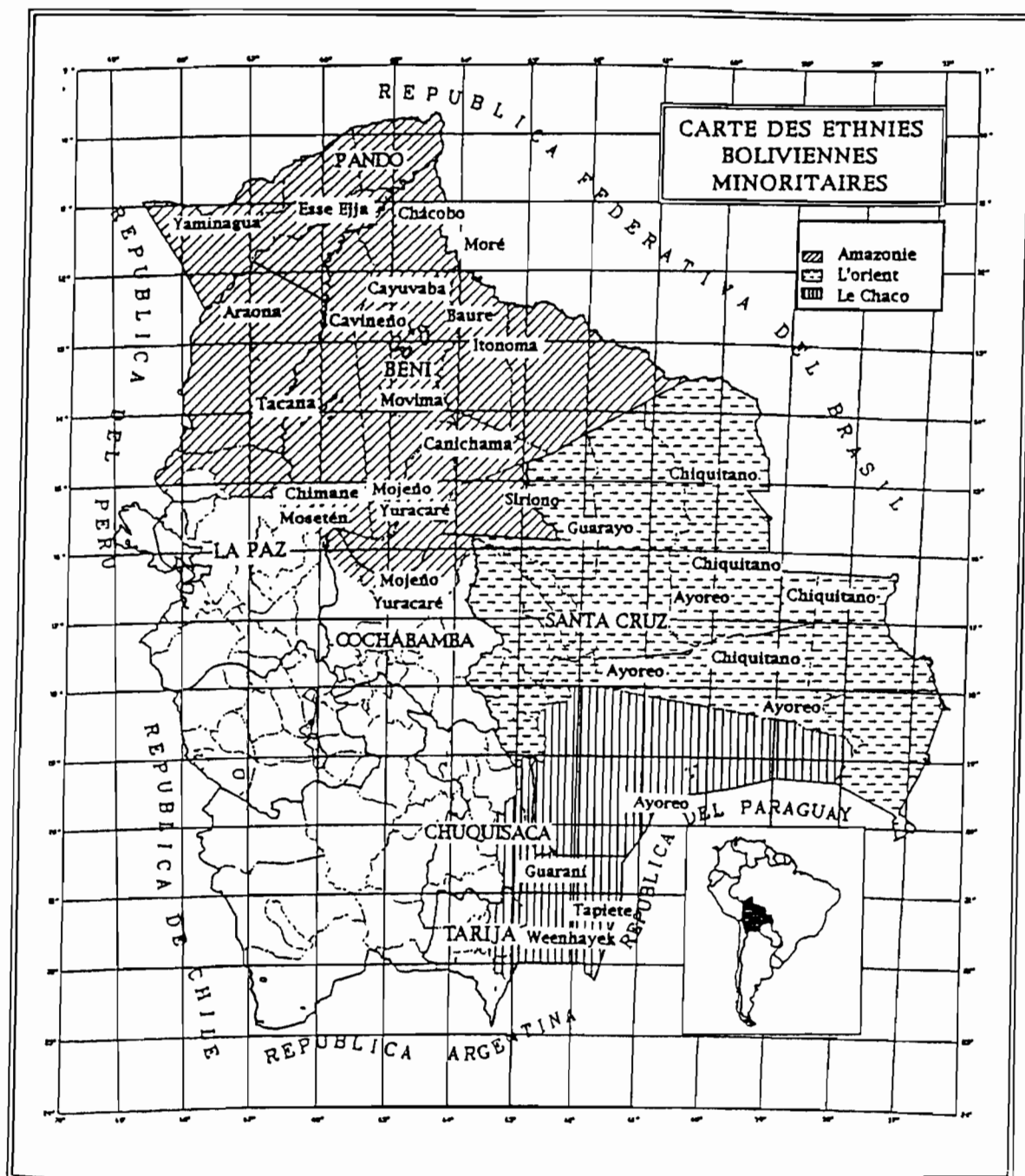


Figure 1. *Distribution géographique des territoires tropicaux occupés par les ethnies minoritaires boliviennes*

Toute la richesse culturelle des ethnies est menacée par une disparition progressive de leur patrimoine. Une étude faite en 1991⁵ montre que seulement 20% des groupes ethniques conserve une certaine intégrité culturelle, presque la moitié présente des signes décisifs d'acculturation et le reste n'a plus aucune identité. Néanmoins les aspects plus profonds de la culture des ethnies comme la connaissance des usages des plantes médicinales ne disparaissent pas aussi vite et survivent plus longtemps que

d'autres, comme ceux liés aux coutumes vestimentaires, aux croyances surnaturelles et cérémonies rituelles ou aux préparations culinaires.

L'économie du pays a été traditionnellement basée sur l'industrie minière de l'argent pendant trois siècles de colonie espagnole puis sur l'industrie de l'étain pendant la république (deuxième producteur mondial jusqu'aux années 70). Actuellement la Bolivie exporte 47% de denrées non traditionnelles (agroindustrie, industrie de l'or, bois précieux et autres), 37% de minéraux (argent, zinc, antimoine, molybdène, étain, fer), 10% d'hydrocarbures et 6% de réexportations.

L'indice de développement humain (IDH)³ place le pays au 113^{ème} rang parmi 175 pays du monde. Cet indice est calculé sur la base de l'espérance de vie, des niveaux d'éducation et des revenus annuels réels par personne. Le pays se trouve ainsi classé parmi les 18 derniers pays du groupe de ceux considérés à développement humain moyen qui en compte 66. C'est le pays le moins développé de l'Amérique du sud entouré de voisins plus développés comme le Chili (30^{ème} rang), l'Argentine (36^{ème} rang) et l'Uruguay (37^{ème} rang); ces derniers appartenant au groupe des pays du monde considérés les plus développés (dont la France, par exemple, est placée deuxième). En Amérique Latine, seuls le Nicaragua, le Guatemala, l'Honduras et Haïti sont considérés comme des pays moins développés que la Bolivie.

I.1.1.Problèmes de santé publique⁶

L'indice de naissance est de 32,2 ‰ et celui de mortalité de 8,4 ‰. La population au delà de 65 ans correspond à 4%, et l'espérance de vie est de 60,9 ans pour les hommes et de 65,9 ans pour les femmes. L'indice de mortalité infantile est l'un des plus élevés, voisin de 75 ‰. Ces chiffres ajoutés, à la situation socioéconomique précédemment décrite, permettent de penser que les problèmes de santé publique en Bolivie sont préoccupants.

Le problème de santé publique considéré comme d'intérêt national et méritant une attention prioritaire, est la diarrhée infantile, principale cause de mortalité chez les enfants pendant leur première année de vie et qui touche la population d'enfants des familles à faibles revenus. Cette maladie touche la population infantile citadine et rurale bolivienne de toutes les régions du pays. La cause principale est le manque de conditions d'hygiène des couches socio-économiques les plus basses. Les mauvaises conditions d'hygiène sont l'initiateur idéal pour l'apparition d'états bactériens ou viraux qui provoquent des désordres gastro-intestinaux chez les enfants. L'absence d'attention médicale appropriée provoque la déshydratation au delà des limites permises qui est naturellement plus rapide chez les enfants, avec pour conséquence la mort du malade.

Les maladies qui touchent la plus grande proportion de la population en particulier celle des régions tropicales du pays (70% du territoire national), abritant 40% de la population, sont bien entendu les maladies tropicales à caractère endémique et d'origine parasitaire, à savoir et par ordre décroissant de prévalence: la malaria ou paludisme, la maladie de Chagas et les leishmanioses. Le Tableau 1 montre les pourcentages de malades déclarés par région.

Tableau 1. *Pourcentage de malades déclarés par région⁴*

Maladie	Région de l'orient	Région du Chaco	Région amazonienne
Diarrhée	84	30	57
Paludisme	11	44	15
Affection Respiratoire	39	11	43
Fièvre	31	13	29
Tuberculose	6	10	4
Rougeole	4	10	2
Maladie de Chagas	*	6	*
Maladies de la peau	*	*	4
Leishmanioses	†	*	*

*pourcentage < 1%

La malnutrition des couches sociales les plus appauvries est aussi un élément important du cadre de santé publique en Bolivie. Cette situation est responsable d'une dépression importante du système immunitaire dans la population en général et dans la population mère-enfant en particulier. Cette dépression aide de manière efficace à l'amplification des statistiques des maladies en particulier celles d'origine parasitaire. Il est en effet connu que des malades contaminés par le parasite de la maladie de Chagas peuvent ne jamais manifester de signes symptomatologiques du fait de leur système immunitaire suffisamment rigoureux pour les protéger.

Les besoins sanitaires des secteurs de la population les plus abandonnés demandent des solutions urgentes, et c'est pour cela qu'il ne faut pas mépriser une médecine alternative végétale d'origine traditionnelle ou ethnique. Les prix prohibitifs des médicaments industriels et l'évolution des parasites et des bactéries vers une chimiorésistance, chaque fois plus importante, imposent aux scientifiques la recherche de médicaments d'origine naturelle issus de la médecine traditionnelle, pouvant être exploités après évaluation de leur indice d'activité biologique.

Les groupes ethniques CHACOBO, RAQAYPAMPENOS et TACANAS, ont été choisis car ils sont originaires de deux régions de biodiversité végétale différentes, et qu'ils occupent des systèmes écologiques qui présentent des caractéristiques uniques. Les Chácobo⁷ et les Tacanas habitent dans l'amazone bolivienne avec une haute incidence de malaria, tandis que les Raqaypampeños⁸ vivent dans les hautes vallées mésothermiques interandines, zone d'endémie de la maladie de Chagas. Ces indigènes quechuas, possèdent une tradition de guérisseurs⁸ comparable à celle des Kallawayas chez les aymaras des hauts plateaux de Bolivie.

I.1.2. Les Chácobos⁴

C'est une tribu amazonienne qui appartient au groupe linguistique Pano, et regroupe environ 500 personnes. A l'origine, ils habitaient à Benicito et Yata, au sud du fleuve Ivon. Les premières données disponibles sur cette ethnie datent de 1923 (travaux de l'ethnologue Nordenskiöld). Entre 1955 et 1980, un premier contact permanent avec des missionnaires européens a permis la réalisation du premier dictionnaire chácobo-espagnol. De 1980 à nos jours une migration de la population vers le nord engendra l'établissement d'une communauté d'environ 300 personnes à Alto Ivon, le reste demeurant encore à Benicito (Figure 2).

Le savoir ethnopharmacologique des Chacobos est partagé par toute la communauté et n'est pas réservé aux seuls savants ou guérisseurs. Toute la population organisée en familles et tout particulièrement les femmes partagent les connaissances sur les propriétés thérapeutiques des plantes qui les entourent.

L'inventaire réalisé par Sylvie Bergeron et collab.⁹ sur les diverses espèces végétales utilisées, montre que prédominent les familles botaniques suivantes:

- Les MORACEAE avec les genres *Helycostylis*, *Pseudolmedia*, *Ficus* et *Brosimum*,
- Les RUBIACEAE avec les genres *Capirona*, *Amaioua*, *Psychotria* et *Coutarea*,
- Les LEGUMINOSAE avec les genres *Sclerolobium*, *Inga*, *Derris* et *Vataireopsis*,
- Les ANNONACEAE avec les genres *Guatteria*, *Unonopsis*,
- Les CHRYSOBALANACEAE avec le genre *Hirtella*,
- Les MYRISTICACEAE avec le genre *Iryanthera*.
- Les VIOLACEAE avec le genre *Rinoreaocarpus*,
- Les CELASTRACEAE avec le genre *Cheiloclinium*,
- Les PIPERACEAE avec le genre *Piper*,
- Les MELASTOMACEAE avec le genre *Miconia*

Les applications les plus fréquemment citées portent sur des problèmes digestifs: diarrhée, maux d'estomac, vomissements, les céphalées, la fièvre, la malaria, les problèmes hépatiques, les aphtes, les problèmes dermatologiques et la cicatrisation, les maux de dents. D'autres utilisations de ces espèces ont été reportées comme matériaux de construction et poisons de pêche (ichtyotoxicité).

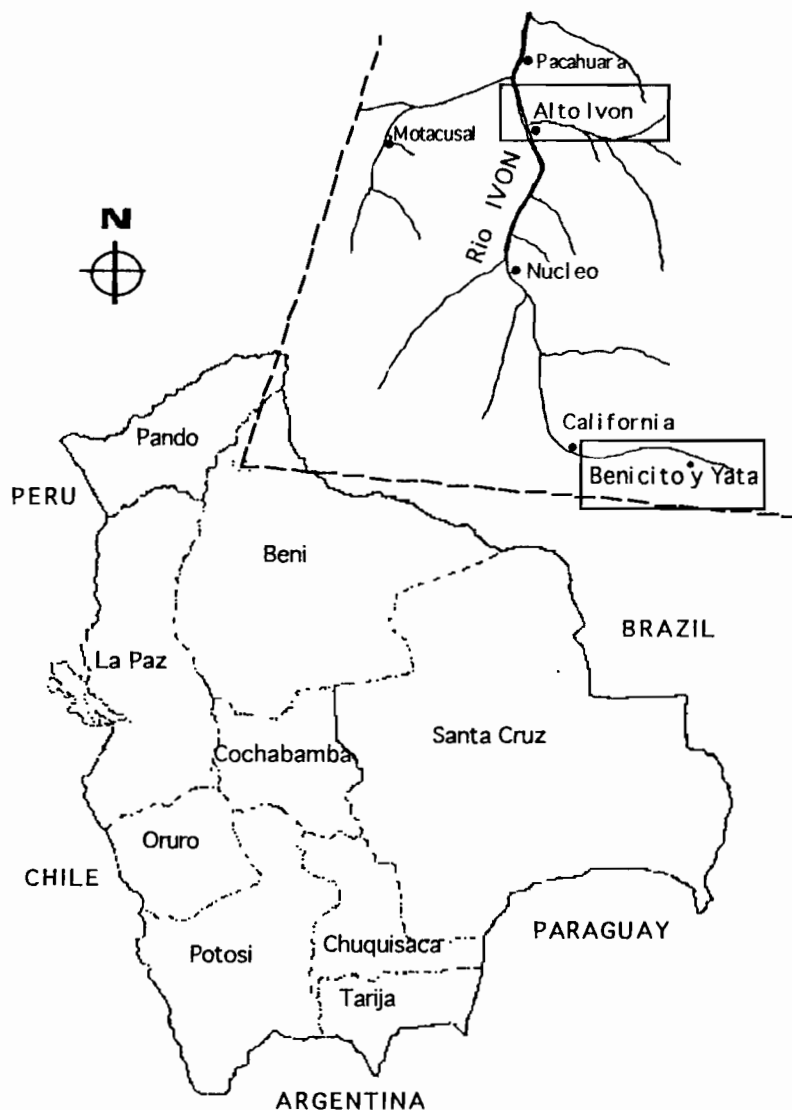


Figure 2. Localisation des communautés Chácobo "Alto Ivon", "Benicito" y "Yata"

I.1.3. Les Raqaypampeños⁴

Ce groupe d'origine quechua demeure dans les vallées mésothermiques de Mizque du département de Cochabamba (Figure 3) à une altitude moyenne de 2800-3000 mètres au dessus du niveau de la mer. La population organisée en syndicats comprend environ 7500 personnes (1500 familles). Nous ne possédons pas beaucoup de données botaniques sur les provinces de Mizque et Campero (dépt. de

Cochabamba). La zone occupée par les Raqaypampeños présente deux étages écologiques: les pampas relativement plates sont utilisées pour les résidences permanentes, tandis que les montagnes et endroits de topographie irrégulière sont l'étage complémentaire (utilisé pour les élevages et l'agriculture).

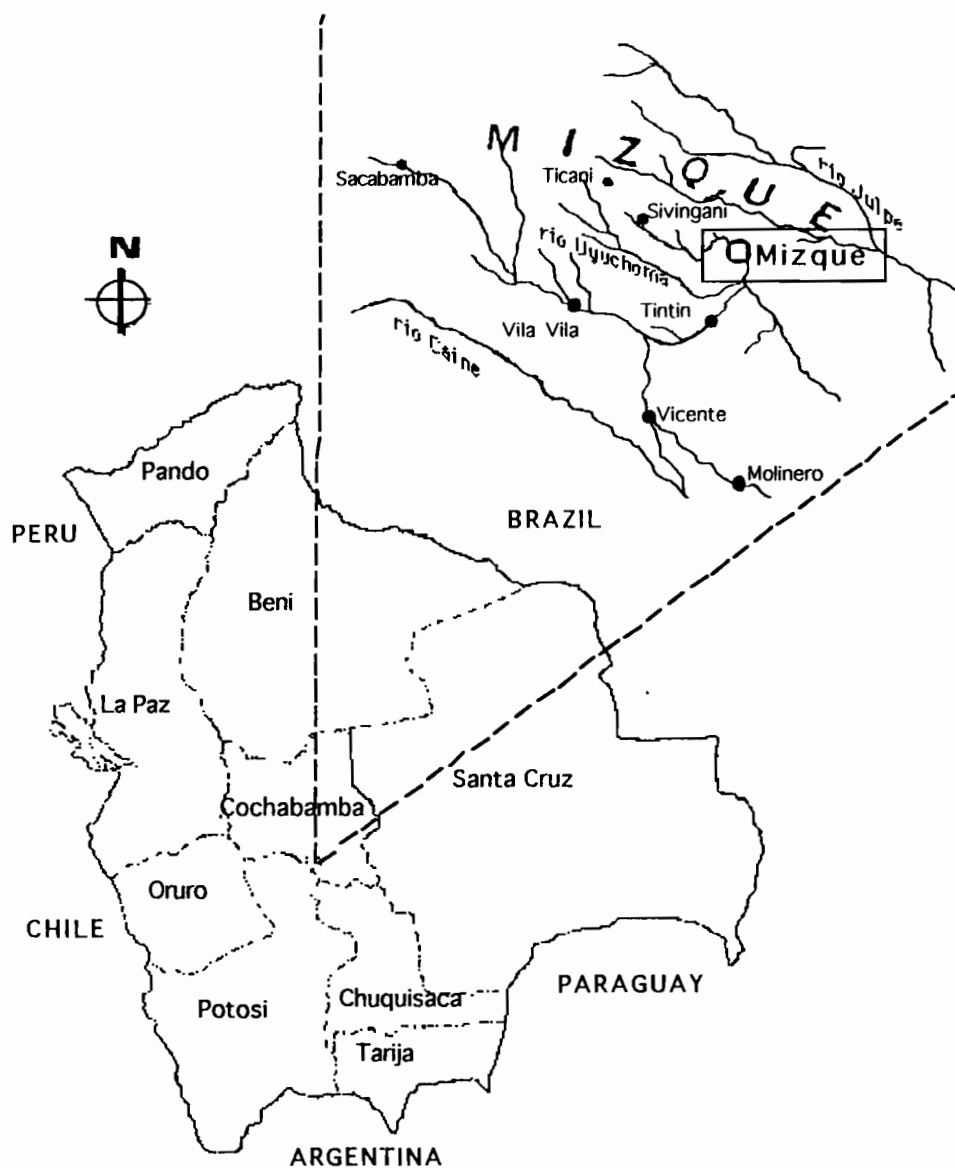


Figure 3. Localisation de la communauté ethnique Raqaypampeños

Les familles de plantes utilisées par les raqaypampeños sont très variées. Les principales sont:

- Les SAPINDACEAE, genre *Lophostigma*,
- Les ANACARDIACEAE, genre *Cardenasiodendron*,
- Les ROSACEAE, genre *Polylepis*,

- Les CACTACEAE, genres *Parodia*, *Echinopsis* et *Blosfeldia*,
- Les BIGNONIACEAE, genre *Tecoma*,
- Les PODOCARPACEAE, genre *Podocarpus*,
- Les MELIACEAE, genre *Cedrela*,
- Les APOCYNACEAE, genre *Aspidosperma*,
- Les FLACOURTIACEAE, genre *Myroxylon*,
- Les LEGUMINOSAE, genre *Tipuana*.

Les maux les plus couramment rapportés en médecine traditionnelle sont la fièvre, les problèmes digestifs, les céphalées et le mal de dos. Quelques espèces sont utilisées pour des soins relatifs à une possible attaque de paludisme. Certaines espèces sont utilisées comme vermifuge, anticoagulant, anti-inflammatoire et anti-allergique, contre les rhumatismes, les furonculoses et comme antalgique.

I.1.4. Les Tacanas¹⁰

Les Tacanas occupent la région nord-ouest de la Bolivie au pied du massif des Andes (cordillera Real), et habitent principalement dans les alentours et dans les villages d'Ixiamas, Tumupasa et San Buenaventura au nord du département de La Paz. D'autres communautés se trouvent disséminées en suivant la course des fleuves Béni, Madre de Dios et Orthon dans les départements du Béni et du Pando vers le nord et nord-est du pays (Figure 4).

La population Tacana était estimée à environ 5000 personnes selon un recensement de 1991. L'organisation sociale est clanique. Leurs principales activités comprennent la chasse, l'agriculture (maïs) et la pêche. L'élevage d'animaux domestiques pour l'alimentation est aussi pratiquée. L'exploitation de plantes sert aussi à la construction de maisons, en utilisant principalement des troncs de bois, des écorces, et des feuilles de palmiers. Les palmiers et le bambou sont aussi utilisés dans la production d'objets d'artisanat, comme des paniers.

Les principales familles de plantes utilisées par les Tacanas¹¹ sont:

- Les ACANTHACEAE, genre *Justicia*,
- Les AMARANTHACEAE, genres *Iresine*, *Anacardium*,
- Les ANACARDIACEAE, genre *Astronium*,
- Les APOCYNACEAE, genres *Aspidosperma*, *Himatanthus*
- Les BIGNONIACEAE, genre *Jacaranda*,

- Les BOMBACACEAE, genre *Cavanillesia*
- Les CUCURBITACEAE, genre *Jacaratia*,
- Les DILLENIACEAE, genre *Curatella*,
- Les EUPHORBIACEAE, genres *Chamaesyce*, *Jatropha*, *Phyllanthus*, *Ricinus*
- Les FABACEAE, genres, *Acaci*, *Amburana*, *Bowdichia*,
- Les FLACOURTIACEAE, genres *Lunania*, *Tetrathylacium*,
- Les HIPPOCRATEACEAE, genre *Salacia*,
- Les ICACINACEAE, genre *Leretia*,
- Les LAMIACEAE, genres *Hyptis*, *Ocinum*,
- Les LAURACEAE, genre *Aniba*,
- Les MALVACEAE, genres *Bixa*, *Gossypium*, *Sida*,
- Les MELIACEAE, genres *Cedrela*, *Guarea*, *Swietenia*,
- Les MONIMIACEAE, genre *Siparuna*,
- Les MORACEAE, genres *Cecropia*, *Coussapoa*, *Ficus*, *Pseudolmedia*,
- Les MYRSINACEAE, genres *Myrsine*, *Stylogine*,
- Les MYRISTICACEAE, genre *Otoba*,
- Les MYRTACEAE, genre *Psidium*,
- Les PHYTOLACCACEAE, genres *Gallesia*, *Petiveria*,
- Les PIPERACEAE, genre *Piper*,
- Les POLYGONACEAE, genre *Triplaris*,
- Les POLYPODIACEAE, genres *Campyloneurum*, *Polypodium*,
- Les SCROPHULARIACEAE, genre *Scoporia*,
- Les SMILACACEAE, genre *Smilax*,
- Les SOLANACEAE, genres *Brugmansia*, *Lycianthes*, *Physalis*,
- Les STERCULIACEAE, genres *Helicteres*, *Theobroma*,
- Les TILIACEAE, genres *Heliocarpus*, *Trumfetta*,
- Les ULMACEAE, genre *Celtis*,
- Les VERBENACEAE, genre, *Vitex*
- Les ZINGIBERACEAE, genres *Costus*, *Zingiber*

La majorité des plantes médicinales s'utilisent principalement pour soigner des problèmes gastrointestinaux tels que la diarrhée, douleur du ventre et dysenterie. D'autres espèces employées dans des affections fongiques et des désordres gynécologiques sont signalées. Il existe aussi des espèces fébrifuges et certaines antirhumatismales.

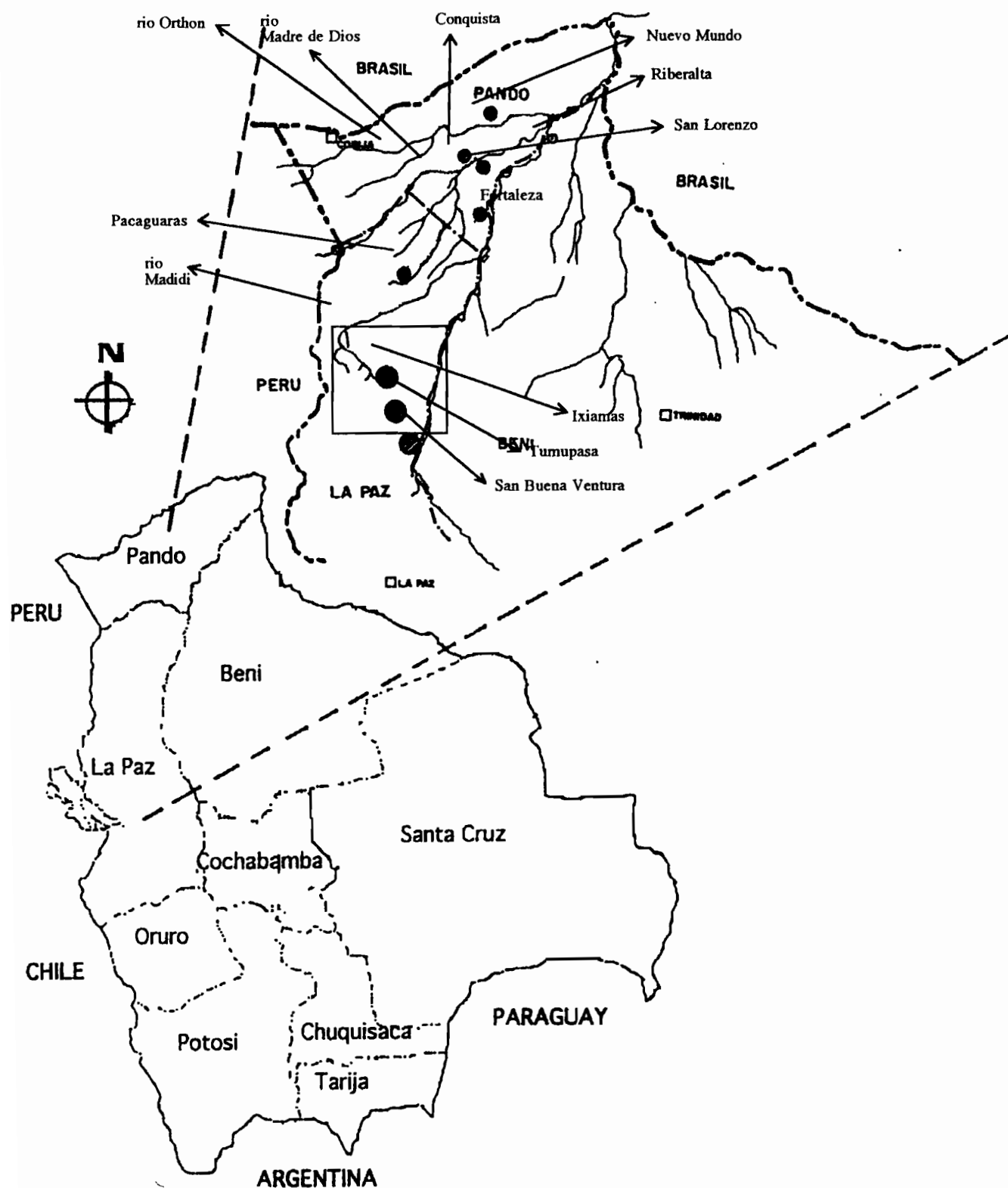


Figure 4. Localisation des communautés ethniques Tacanas

1.2. Les grands problèmes d'origine parasitaire en Bolivie

Les parasites sont présents sur toute la surface du globe et, en raison de conditions particulières, leur présence est favorisée dans les zones intertropicales. Il a été estimé que quelques 270 millions de personnes sont contaminées annuellement par la malaria. La moitié de la population mondiale se trouve en zone d'endémie. Trois cent cinquante millions de personnes sont susceptibles d'être contaminés par un type de leishmaniose, 90 millions par la maladie de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) et 50 millions peuvent être affectés par la maladie du sommeil (*T. brucei*) en Afrique.¹²

En Bolivie, certaines maladies parasitaires sévissent plus ou moins durement, notamment la malaria ou paludisme, la leishmaniose et la maladie de Chagas. Nous énoncerons brièvement certaines caractéristiques de ces maladies.^{13,14,15,16}

1.2.1. Le paludisme

1.2.1.1. Définition

Les paludismes sont des maladies parasitaires aiguës, d'évolution chronique, caractérisées par des accès fébriles intermittents et par une anémie sévère. Les agents pathogènes sont des protozoaires du genre *Plasmodium* transmis dans la nature par des moustiques femelles du genre *Anophèle*. Le genre *Plasmodium* comprend plus de 100 espèces dont 22 infectent les singes, 2 sont pathogènes pour les reptiles et les oiseaux, et 4 sont pathogènes pour l'homme:

- *P. vivax* : responsable d'une fièvre tierce bénigne,
- *P. ovale* : responsable d'une fièvre tierce bénigne,
- *P. falciparum* : responsable d'une fièvre tierce maligne ou fièvre pernicieuse,
- *P. malariae* : responsable d'une fièvre quarte bénigne.

Le cycle du parasite (Schéma 1) fait intervenir 2 hôtes, le moustique à l'intérieur duquel se déroule la phase sporogonique ou sexuée, et l'homme chez qui s'effectue la multiplication asexuée ou schizogonique comprenant 2 phases: le cycle exoérythrocytaire dans les cellules hépatiques et le cycle érythrocytaire qui se déroule, comme son nom l'indique à l'intérieur des globules rouges.

1.2.1.2. Épidémiologie

Le paludisme est un problème de santé mondiale surtout en zones tropicales. En dessous d'un certain seuil thermique (15 à 18°C), les parasites meurent chez l'insecte, aussi la présence du paludisme dans les pays tempérés n'est pas continue.

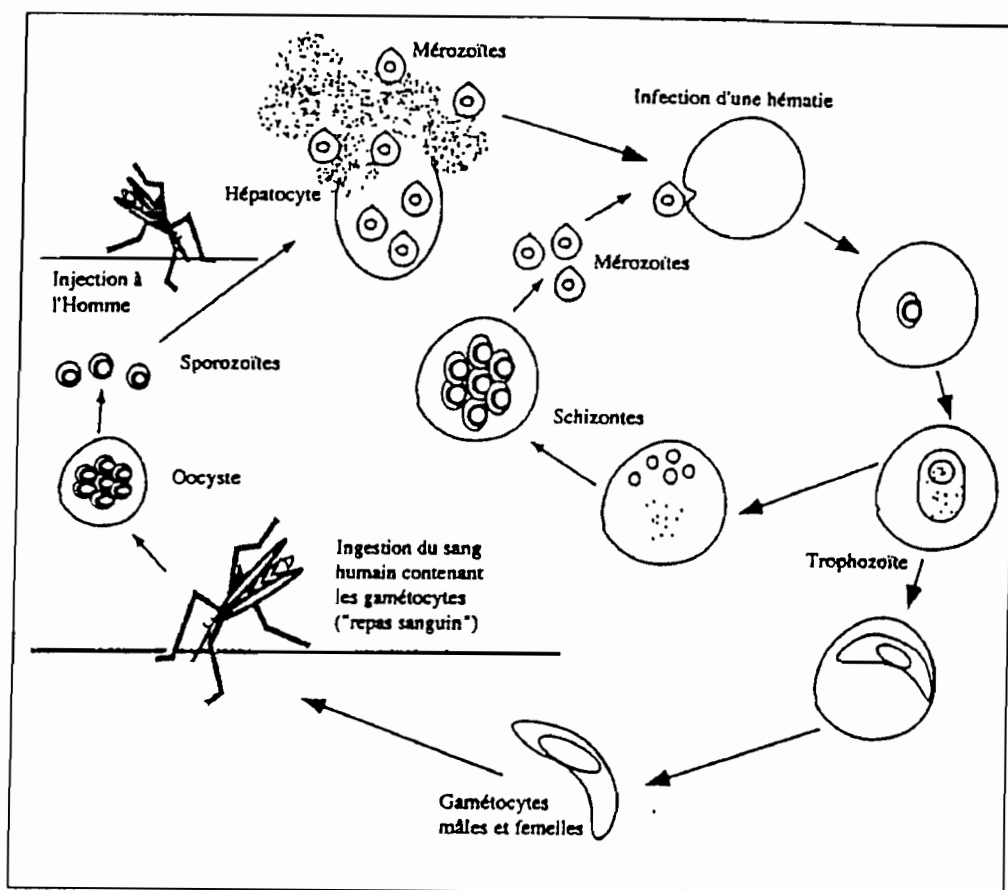


Schéma 1. Le cycle du *Plasmodium* chez l'homme et chez l'anophèle²⁰

La température idéale pour l'évolution des parasites est de 27°C. Cette température existant de façon permanente dans les zones tropicales et intertropicales, l'évolution du parasite est continue. A cela s'ajoute la présence d'Anophèles dans les eaux douces ou saumâtres stagnantes, couramment rencontrées dans ces pays.

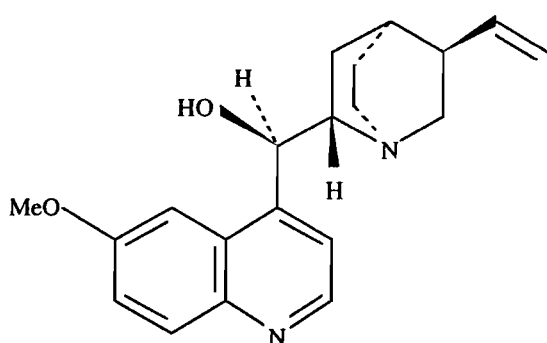
En Bolivie, le paludisme se répartit dans les régions chaudes, globalement les régions de l'Amazonie, de l'Orient et Du Chaco (Figure 1). Ces régions sont: le département de La Paz dans ses provinces Yungas du nord et Yungas du sud, régions possédant un climat semi-tropical dans ses vallées descendantes des Andes vers le plateau amazonien, le département du Béni dans ses provinces Ballivián et Vaca Díez, le département de Pando dans ses provinces General Román, Manunpí et Madre de Dios, le département de Santa Cruz dans la province Cordillera, le département de Chuquisaca avec la province Luis Calvo, et le département de Tarija pour la province Gran Chaco. Ainsi, 40% de la population qui habite dans ces régions risque d'être contaminés par la maladie.¹⁷ En

1995 le nombre de personnes contaminées était estimé à 320000 cas. Les parasites incriminés sont principalement *P. vivax* (92,8% des cas) et *P. falciparum* (7,2%).

La transmission peut également se faire de manière accidentelle lors de transfusions sanguines ou par l'intermédiaire de matériel médical souillé. Plus rarement on observe des transmissions congénitales ou par contamination du fœtus par le sang maternel.

I.2.1.3. Chimiothérapie¹²

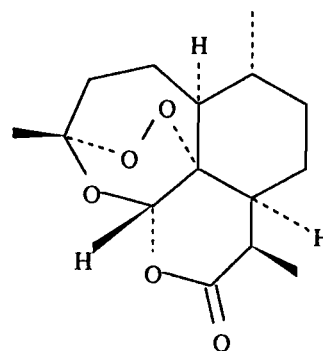
La chimiothérapie exige que le principe actif médicamenteux possède une action sélective et qu'il soit dépourvu de toxicité sur l'organisme hôte des parasites. Le premier grand antipaludique, la quinine,¹⁸ est d'origine naturelle. Il demeure l'antipaludique majeur utilisé à l'heure actuelle; c'est un alcaloïde quinoléique schizonticide isolé des espèces *Cinchona* de la famille des Rubiaceae. Son mode d'action est encore discuté et peut se résumer en une fixation sur la membrane du parasite et blocage de la dégradation de l'hémoglobine où d'inhibition de la synthèse protéique du parasite; il se manifesterait aussi par inhibition de la polymérisation de l'hème en hémazoïne. La seconde substance naturelle employée comme antipaludique et isolée d'une plante chinoise de la famille des Asteraceae, *Artemisia annua* est l'artémisinine,¹⁹ lactone sesquiterpénique à endoperoxyde qui agit comme schizonticide. Bien que son mode d'action ne soit pas entièrement connu, l'artémisinine se fixe sur les membranes des parasites où il y a une production de radicaux libres oxygénés destructifs. Son site actif est le groupement: 1,2,4 trioxane. Un de ses avantages est qu'elle agit contre les souches de *Plasmodium* chloroquino-résistantes (scr) et en cas d'accès pernicieux. Son activité est rapide mais fugace.



quinine

CI₅₀ 0,0455 µM

souche chloroquine-sensible (scs)



artémisinine

CI₅₀ 0,0039 µM

souche chloroquine-sensible (scs)

CI₅₀ 0,0014 µM

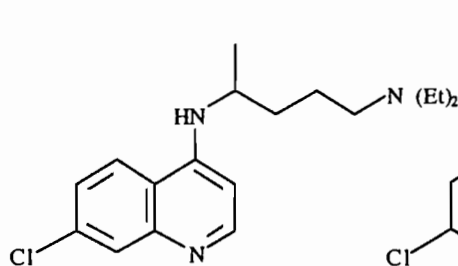
souche multi-drogues-résistante (smr)

Tous les autres antipaludiques importants sont des substances de synthèse ou d'hémisynthèse. Ils se répartissent en deux grandes classes suivant leur cible: les schizonticides et les gamétocides. Les schizonticides sont les plus nombreux et se répartissent en deux grands groupes. Le groupe I correspond à des substances à action rapide et à apparition de résistance long term. Ce sont :

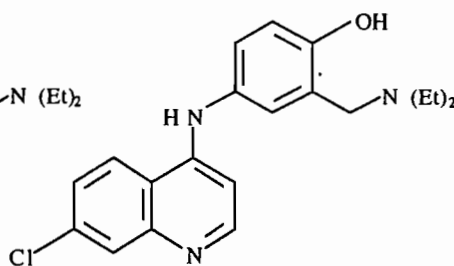
- les amino-4-quinoléines: chloroquine¹⁸ (*Nivaquine*®), amodiaquine¹⁸ (*Flavoquine*®)
- les arylméthanols: méfloquine¹⁸ (*Lariam*®), halofantrine (*Halfan*®)

Le groupe II correspond à des substances à action lente entraînant des résistances rapides. Ce sont tous des agents antifoliques inhibiteurs de la dihydrofolateréductase.

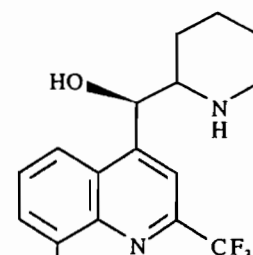
- les sulfones: 4,4'-diamino-diphényl sulfone (*Disulone*®),
- les sulfamides: 4-sulfanilamido-5,6-diméthoxypyrimidine (*Fanasil*®)
- les biguanidines: chloroguanide ou proguanil (*Paludrine*®),
- les 2,4-diamino-pyrimidines: pyriméthamine (*Malocide*®)



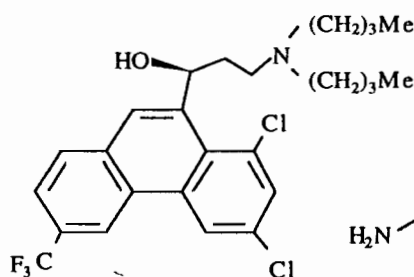
chloroquine
CI₅₀ 0,0066 µM (scs)



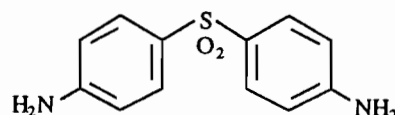
amodiaquine
CI₅₀ 0,0097 µM (scs)



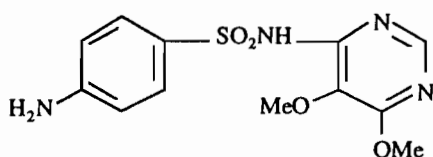
méfloquine
CI₅₀ 0,044 µM (scs)



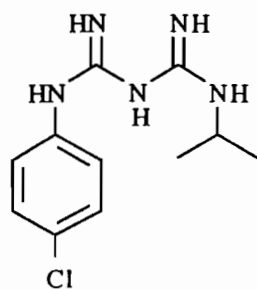
Halofantrine



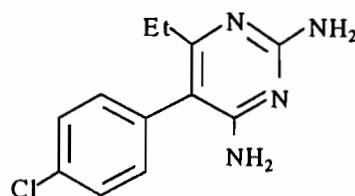
4,4'-diamino-diphényl sulfone



4-sulfanilamido-5,6-diméthoxypyrimidine

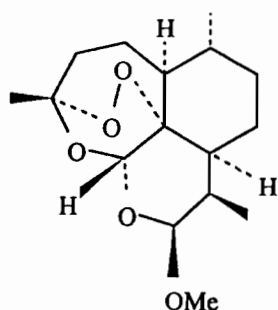


chloroguanide

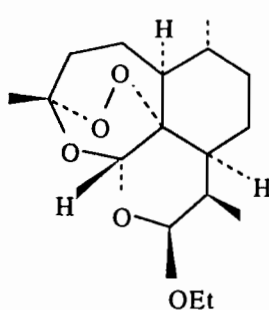


pyriméthamine

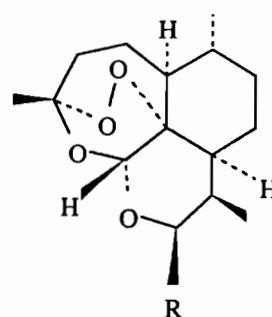
L'artémisinine est peu soluble dans l'eau et les graisses, mais très soluble dans les solvants aprotiques peu polaires comme l'éther de pétrole ou l'éther éthylique. L'insolubilité dans l'eau étant un facteur défavorable pour l'utilisation thérapeutique, des dérivés ont été préparés; on a ainsi synthétisé les éthers de la dihydro-artémisinine, l'artéméther et l'arté-éther, et les esters comme l'artésunate de sodium et l'artéline de sodium.²⁰ Ces analogues présentent de meilleurs niveaux d'activité que l'artémisinine. L'artéméther est en phase de développement chez Rhone-Poulenc Rorer sous le nom de *Paluther®* pour l'administration par voie intra-musculaire.



artéméther



arté-éther



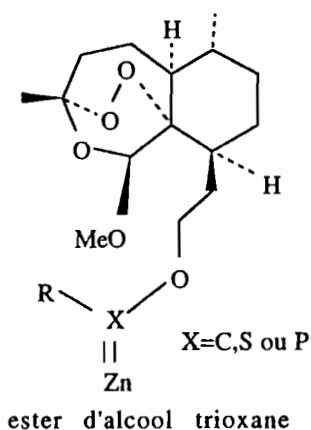
R=OCO(CH₂)₂COONa

artésunate de Na

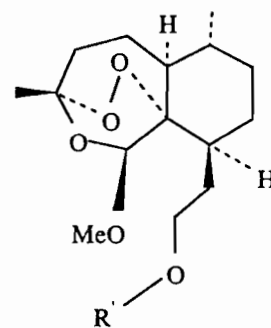
R=OCOCH₂PhCOONa

artéline de Na

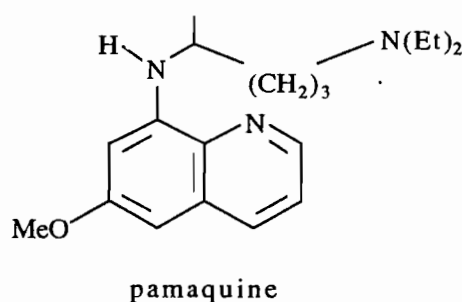
Des nouvelles générations d'antipaludiques peuvent être développées à partir du 1,2,4-trioxane qui est le site actif de la molécule d'artémisinine, comme par exemple, des dérivés d'esters et d'éther d'alcool trioxane. Plusieurs de ces dérivés sont plus actifs comme agents antipaludiques que l'artémisinine.¹⁹



	$CI_{50}(\mu M)$	
	s.c.s	s.m.r
R	ester	
PhCOOMe	<0,0012	<0,0012
PhCONEt ₂	<0,0014	<0,0014
NEt ₂	<0,0004	0,0017
NPh ₂	<0,0002	0,0039
R'	éther	
CH ₂ Ph	0,0004	0,0054
CH ₂ CH=CH ₂	0,0014	0,0039

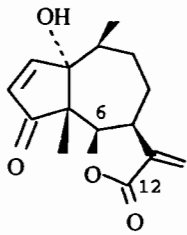
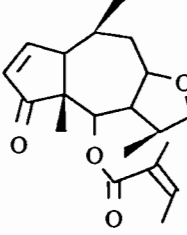
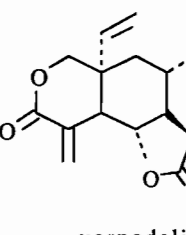
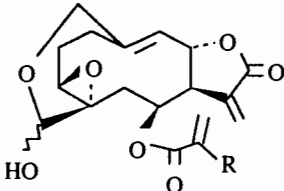
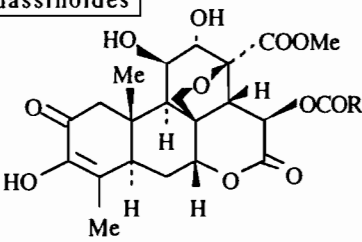
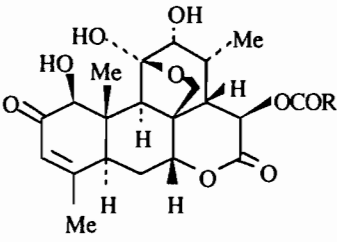
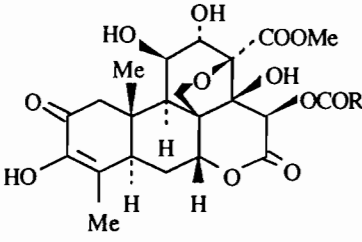


Enfin les seules substances de synthèse à activité gamétocide utilisées sont les 8-aminoquinoléines: pamaquine (*Plasmoclon®*). Des associations peuvent être faites entre ces diverses substances.



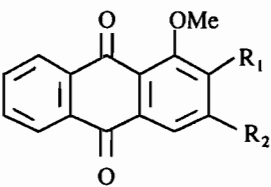
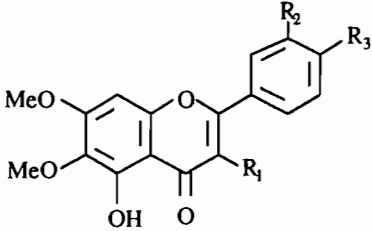
La recherche de nouveaux antipaludiques est rendue nécessaire par la chimiorésistance que développent les parasites. Les molécules concernées par cette chimiorésistance de *P. falciparum* sont la quinine elle même et ses dérivés de synthèse comme la chloroquine, l'amodiaquine ou la méfloquine, mais aussi d'autres classes de composés comme le mélange sulfadoxine-pyriméthamine. Cette recherche a permis l'isolement de certaines substances naturelles intéressantes par leur activité antipaludique dont les principales sont ici répertoriées. Ces molécules peuvent se classer en six groupes: sesquiterpènes et quassinoides (Tableau 2), quinones et flavonoïdes (Tableau 3) et alcaloïdes quinoléiques et alcaloïdes indoliques (Tableau 4).¹²

Tableau 2. *Terpénoïdes à activité antipaludique*

Sesquiterpènes			
 parthenine^a CI₅₀ 0,0049 μM	 brevelineA^b CI₅₀ 0,0094 μM	 vernodaline^c CI₅₀ 0,011 μM	 vernolide^c, R=Me CI₅₀ 0,024 μM hydroxyvernolide^c R=CH₂OH CI₅₀ 0,031 μM
Quassinoides			
 brusatol^f R=CH=CHMe₂ CI₅₀ 5,93x10⁻⁶ μM	 ailanthinone^e R=C(Me)(H)Et CI₅₀ 4x10⁻⁵ μM	 bruceine D^f R=OH CI₅₀ 7,4x10⁻⁵ μM	

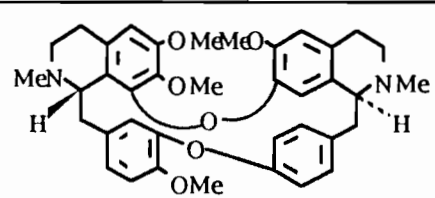
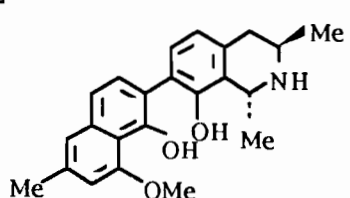
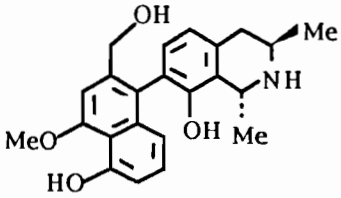
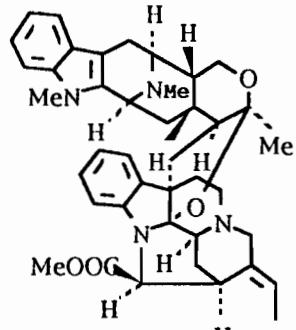
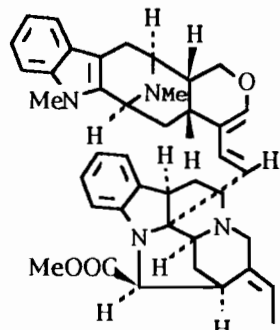
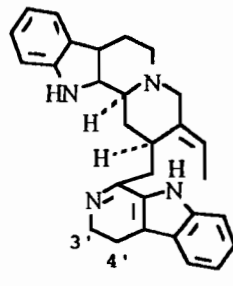
a: de *Parthenium hysterophorus*; ²¹ mode d'action: formation d'adducteurs de Michael avec des nucléophiles comme des groupes thiols de certaines enzymes et protéines; b: de *Centipeda minima*; ¹² c: de *Vernonia amygdalina*; ²² d: de *Brucea javanica*; ²³ site actif: pont méthylène - oxygène entre C-8 et C-11 ou C-8 et C-13, aussi l'état d'oxydation et de substitution du cycle A et la nature de l'acide estérifiant le C-15; e: de *Ailanthus altissima*; ¹² f: de *Brucea javanica* ²⁴

Tableau 3. *Anthraquinones et flavonoïdes à activité antipaludique*

 digitolutein,^k R₁=OH, R₂=Me rubiadin-1-méthylether,^k R₁=Me, R₂=OH damnacanthol,^l R₁=CHO, R₂=OH CI₅₀ 8,1 - 12,9 μM	 circilineol,^l R₁=H, R₂=OMe, R₃=OH CI₅₀ 0,036 μM eupatorine,^l R₁=H, R₂=OH, R₃=OMe CI₅₀ 0,065 μM chrysoplenol D,^l R₁=MeO, R₂=R₃=OH CI₅₀ 0,032 μM
--	---

k: de *Morinda lucida*; ²⁵ l: de *Artemisia annua*; ²⁶ potentialisateur de l'artémisinine

Tableau 4. Alcaloïdes à activité antipaludique

Bisbenzyl- et naphthylisoquinoléines		
 phaeanthine^g CI_{50} $6,1 \times 10^{-4} \mu M$	 dioncophylline B^h CI_{50} $1,7 \times 10^{-4} \mu M$ (smr) CI_{50} $6,2 \times 10^{-4} \mu M$ (scs)	 dioncopeltine A^h CI_{50} $8,7 \times 10^{-4} \mu M$ (smr) CI_{50} $5,5 \times 10^{-5} \mu M$ (scs)
Alcaloïdes indoliques dimères et les analogues de l'émétine		
 villastonineⁱ CI_{50} $2,9 \mu M$	 macrocarpamine^j CI_{50} $9,3 \mu M$	 3',4'-dihydro-usambarensine^j CI_{50} $0,023 \mu M$

g: de *Triclisia patens*;²⁷ h: de *Triphyophyllum peltatum*;²⁸ i: de *Alstonia angustifolia*;²⁹ j: de *Strychnos usambarensis*³⁰

La majorité de ces molécules testées pour la plupart seulement *in vitro* ne seront jamais développées, car ces composés ne sont pas suffisamment actifs, ou sont insuffisamment sélectifs, ou trop toxiques. Néanmoins, la découverte de nouvelles structures antipaludiques peut conduire à la préparation d'analogues synthétiques ou hémisynthétiques plus actifs ou qui aideront à comprendre les modes d'action des molécules antiparasitaires.¹²

I.2.2. La leishmaniose

I.2.2.1. Définition

Les leishmanioses sont des histo-parasitoses, maladies cutanées, cutanéomuqueuses et viscérales engendrées par des agents pathogènes protozoaires du genre *Leishmania* et transmise au cours de la piqûre d'insectes hématophages à activité nocturne de la famille des Phlebotomidae des genres *Phlebotoma*, *Lutzomia* et *Psychodopygus*. Le genre *Leishmania* comprend 30 taxons répartis en 2

sous-genres, *Leishmania* et *Vannia*. On distingue 6 espèces importantes pour l'infection chez l'homme: *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. aethiopica* et *L. donovani*.

Le cycle est un cycle hétéroxène, c'est à dire qu'il fait intervenir plusieurs hôtes, le mammifère (homme, chien, carnivores sauvages, rongeurs) et l'insecte. La cellule cible du parasite est le macrophage tissulaire dans la peau dans le cas des leishmanioses cutanées ou muqueuses, dans le foie dans le cas des leishmanioses viscérales. Les leishmania se retrouvent à l'intérieur des cellules hépatiques, de la rate, des ganglions, de la moëlle osseuse et de la peau.

1.2.2.2.Épidémiologie

Les leishmanioses sont des maladies que l'on rencontre dans les régions intertropicales et tempérées chaudes. Quatre vingt dix sept pays seraient infestés et annuellement 400000 cas, toutes formes cliniques confondues, sont observés. Les différentes *Leishmania* se répartissent de la manière suivante:

Leishmanioses cutanées du Vieux Monde : (ou "Bouton d'Orient")

- L. tropica* (bassin Méditerranéen, Proche et Moyen-Orient)
- L. major* (idem, Afrique noire)
- L. aethiopica* (Afrique de l'Est)

Leishmanioses tégumentaires du Nouveau Monde :

- L. mexicana* et *L. amazonensis* (Amérique Latine et centrale)
- *L. braziliensis* (pays andins)

Leishmanioses viscérales : (ou Kala-Azar)

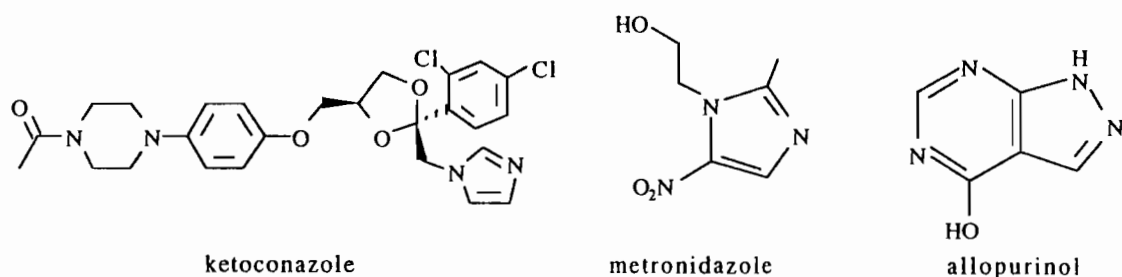
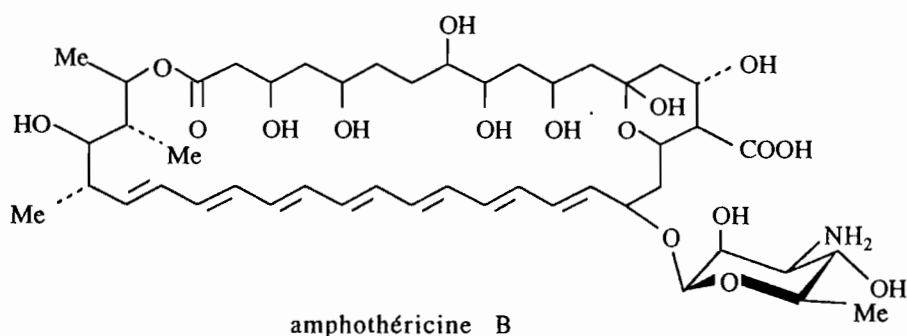
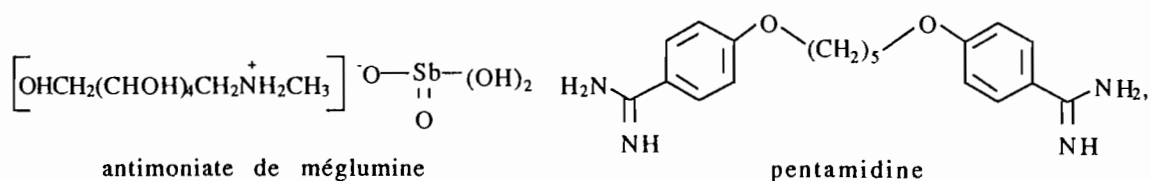
- L. donovani* (Inde, Chine, Afrique)
- L. infantum* (bassin méditerranéen)
- L. chagasi* (Amérique Latine)

En Bolivie, les leishmanioses dermiques sont connues depuis l'époque Inca, sous le terme "quech de uta" et "uta" pour les formes cutanées et "espundia" pour les cutané-muqueuses, termes encore parfois utilisés par l'ethnie Quechua. On peut également observer sur les céramiques du vieux Pérou et sur l'art précolombien des formes anthropomorphes présentant les symptômes de ces maladies.

I.2.2.3. Chimiothérapie

Seules quelques substances possèdent une activité sur les leishmanioses. Cependant, même si elles présentent une relativement bonne activité, elles peuvent être responsables de divers effets secondaires indésirables, et de contre-indications. Actuellement sont disponibles:

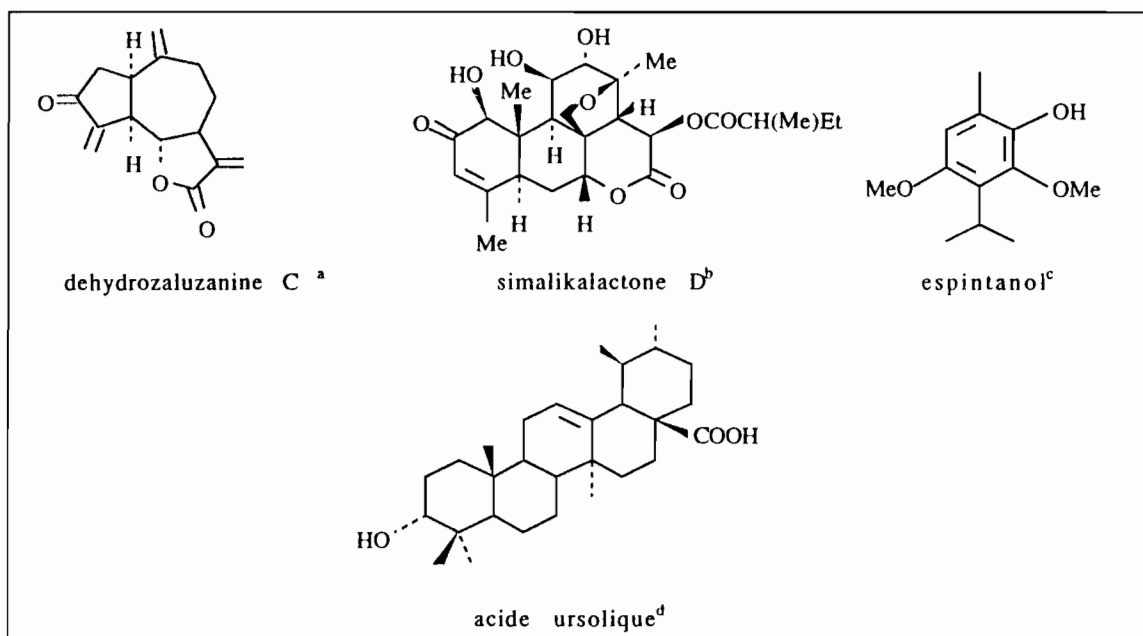
- l'antimoniote de méglumine (*Glucantime*®), dans le cas de formes cutanées et viscérales,
- la pentamidine (*Lomidine*®), pour les formes cutanées,
- l'amphotéricine B (*Fungizone*®, *Amphotericine B*®), pour les formes cutanées et viscérales,
- le ketoconazole (*Nizoral*®), le métronidazole (*Flagyl*®) et l'allopurinol (*Zyloric*®) peuvent être utilisés mais leurs efficacités sont discutées.



Des recherches réalisées sur ces dix dernières années sur les plantes boliviennes utilisées en médecine traditionnelle ont permis l'identification de nouvelles classes de molécules naturelles actives. Les résultats les plus significatifs, sont ceux obtenus avec les alcaloïdes quinoléiques de l'espèce bolivienne *Galipea longiflora*.³¹ Un autre résultat important a été obtenu avec les chalcones prénylées des espèces *Glycyrrhiza spp.*,³² utilisées en médecine chinoise. Les principales molécules isolées qui ont démontré une activité contre diverses souches de *Leishmania* sont répertoriées dans les tableaux

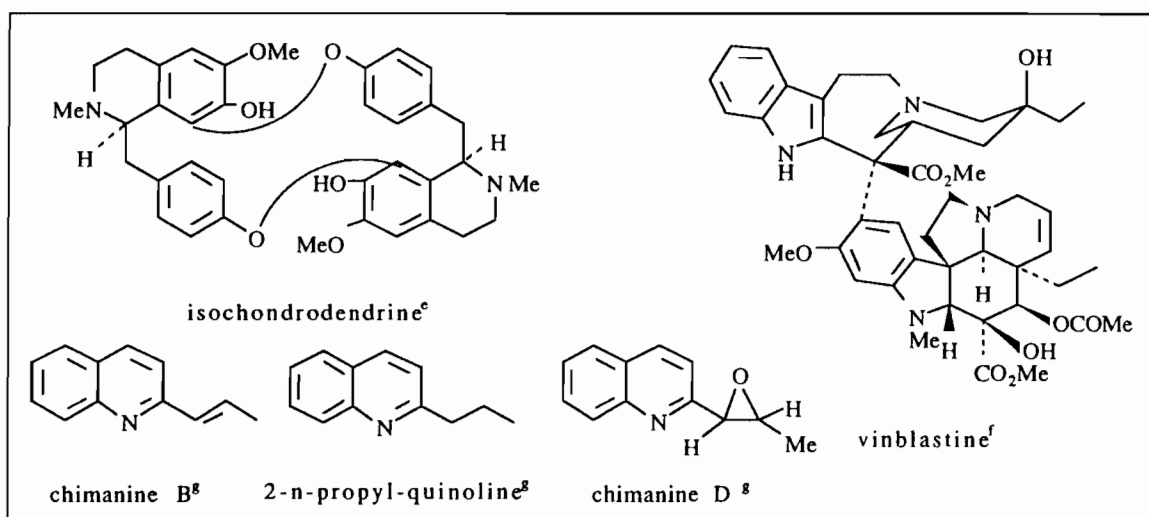
suivants: Tableau 5 pour les terpénoïdes, Tableau 6 pour les alcaloïdes, et Tableau 7 pour des quinones et chalcones.

Tableau 5. *Terpénoïdes à activité leishmanicide*



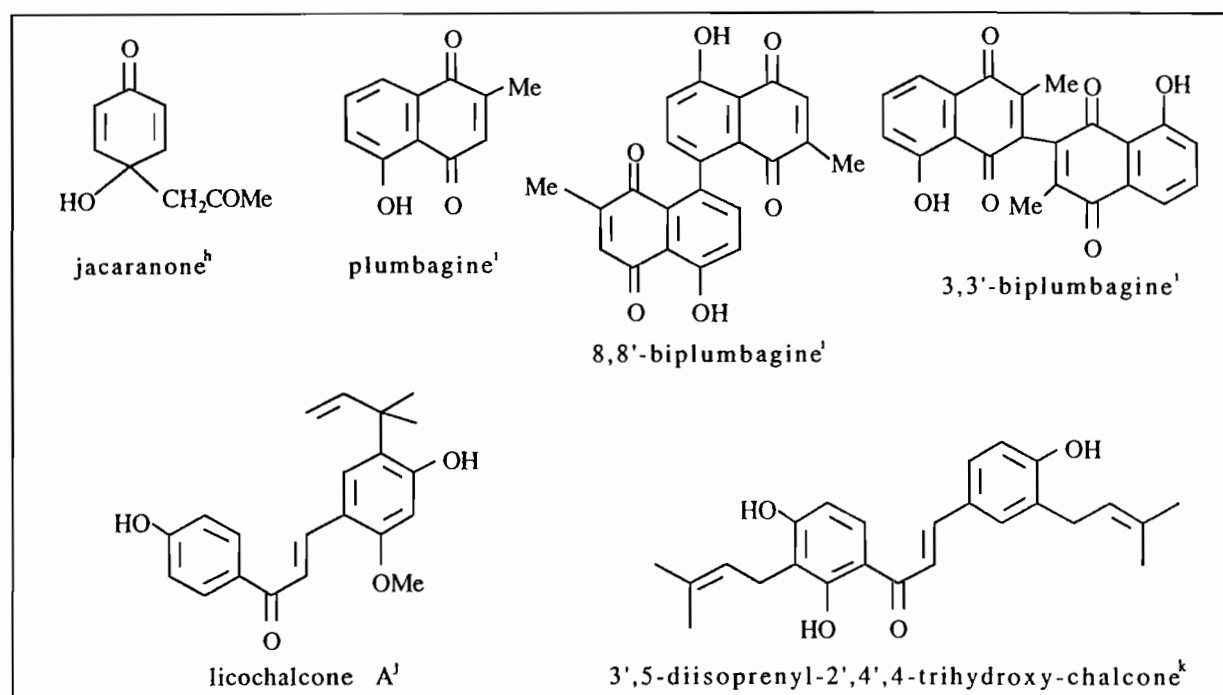
a: de *Munnozia maronii*; ³³ Inhibe la croissance de 12 souches de promastigotes de *Leishmania* à des concentrations de 0,01 à 0,2 µM. Réduction des lésions par *L. amazonensis* chez la souris; b: de *Simarouba amara*; ³⁴ c: de *Oxandra espinata*; ³⁵ actif contre les promastigotes de 12 formes de *Leishmania*, CI_{50} de 0,047-0,12 µM; d: de *Jacaranda copaia*; ³⁶ ED_{50} 0,02 mM contre les formes amastigotes de *L. amazonensis* *in vitro*, non toxique pour les macrophages. Réduction des lésions cutanées de *L. amazonensis* chez la souris.

Tableau 6. *Alcaloïdes à activité leishmanicide*



e: des espèces *Isolona* et de *Curarea candicans*; ³⁷ 93 % et 94 % d'inhibition des parasitemies de *L. brasiliensis brasiliensis* et *L. donovani* à 25 µg/ml; f: de *Catharanthus roseus*; ³⁸ g: de *Galipea longiflora*; ³¹ aussi puissant que le glucantime contre de *L. amazonensis*.

Tableau 7. Quinones et chalcones à activité leishmanicide



h: de *Jacaranda copaia*; ³⁶ CI_{50} 20 μ M contre les formes promastigotes de *L. amazonensis*, toxique sur les macrophages; i: de *Pera benensis*; ³⁹ réduction des lésions dues à *L. mexicana* et *L. venezuelensis* chez la souris j: de *Glycyrrhiza spp.*; ³² k: *Glycyrrhiza spp.* ⁴⁰

I.2.3. La maladie de Chagas

I.2.3.1. Définition

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine est une parasitose provoquée par un protozoaire flagellé, *Trypanosoma cruzi* que l'on rencontre sous trois formes: trypomastigote, épimastigote et amastigote (ou forme leishmanoïde). La transmission s'effectue par les déjections de punaises hématophages de l'ordre des hémiptères, de la famille des Reduviidae, de la sous famille des Triatominae: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* ou *Triatoma dimidiata*. Les noms vernaculaires de ces insectes sont Vinchuca ou Chupon.

Le cycle comprend 2 types d'hôtes: l'insecte vecteur et le mammifère (homme, chien, chat, animaux sauvages divers).

I.2.3.2. Épidémiologie

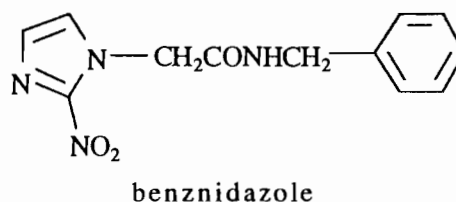
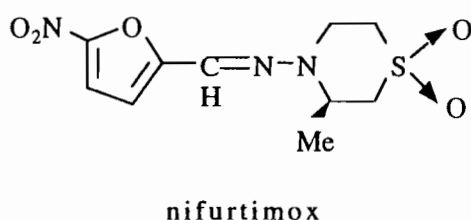
La maladie de Chagas est un grave problème de santé publique en Amérique Latine. L'OMS présente en 1995 les chiffres de 16 à 24 millions de personnes infestées sur tout le continent sud américain. Les

Triatomés se rencontrent entre le 43° nord et le 49° sud, c'est à dire entre le sud de la Californie et le centre de l'Argentine. Cependant la zone d'hyperendémie est plus restreinte et se situe entre le sud du Brésil, le nord de l'Argentine, la Bolivie, l'Uruguay et le Paraguay. Cette maladie des zones suburbaines et rurales a de grandes répercussions sur la santé et l'économie de ces pays qui manquent de méthodes pour les diagnostics, les investigations cliniques et les études anatomo-pathologiques. De plus les formes cliniques varient grandement entre les régions. Enfin les traitements sont excessivement chers pour les populations atteintes par la maladie.

En Bolivie, l'aire endémique comprend toute la partie de la forêt humide jusqu'aux vallées des Andes à une altitude d'environ 2000 mètres au dessus du niveau de la mer. Le vecteur prédominant est *Triatoma infestans*, et environ 1,2 million de personnes sont infestées.

1.2.3.3. Chimiothérapie

Suivant les régions, les substances les plus utilisées contre les états aigus de la maladie sont: le nifurtimox (*Lampit®*) et le benznidazole (*Radonil®*) qui sont faiblement tolérés présentant de nombreux effets secondaires indésirables, et diverses interactions médicamenteuses.



Il n'existe aucun médicament contre les phases chroniques de la maladie qui entraînent des troubles cardiaques et digestifs graves conduisant le plus souvent à la mort.

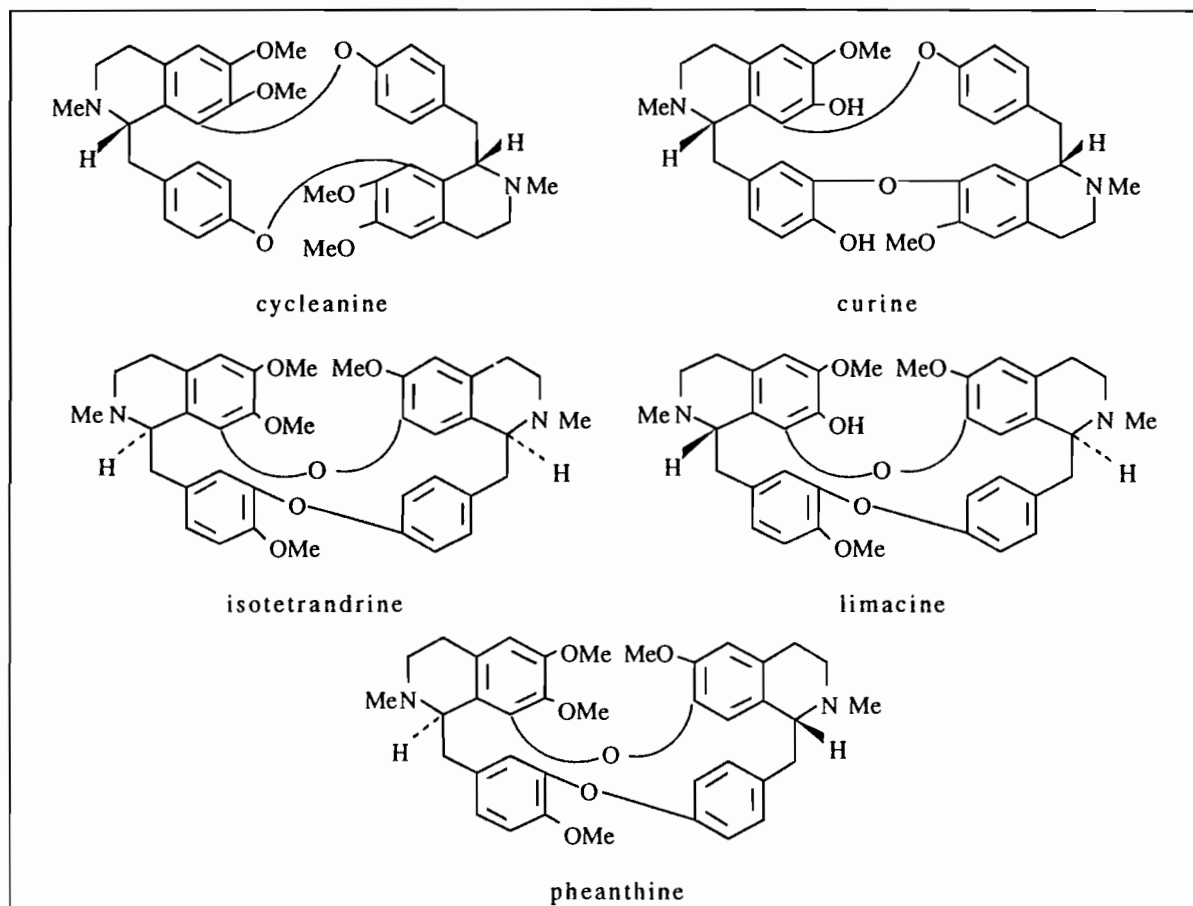
Dû à l'absence de manifestations symptomatologiques visibles, la médecine des ethnies ne rapporte pas en général de plantes spécifiques pour le traitement de cette maladie.

Parmi les molécules naturelles actives contre les leishmanioses, celles qui ont montré une activité contre *T. cruzi* sont:

- la déhydrozaluzanine C³³ (Tableau 5), qui inhibe la croissance d'épimastigotes de 15 souches de *T. cruzi*, *in vitro* à des concentrations de 0,01 à 0,2 μ M,
- l'espintanol³⁵ (Tableau 5) qui est actif contre 20 souches de *T. cruzi* avec une CI₅₀ qui varie de 0,12 à 0,50 μ M, comparable au benznidazole,
- la vinblastine³⁸ (Tableau 6), qui provoque une inhibition complète de la reproduction de *T. cruzi* à la concentration de 0,006 μ M.

L'activité de cinq alcaloïdes bisbenzylisoquinoléïques (Tableau 8) sur des souris infestées par deux souches de *T. cruzi* a été comparée avec celle du benznidazole.⁴¹

Tableau 8. *Bisbenzylisoquinoléïnes actives contre Trypanosoma cruzi*



Le traitement oral le plus efficace chez la souris correspond à la cycleanine à la dose de 2 mg/kg/jour et la curine à 10 mg/kg/jour pendant 10 jours. La même efficacité est obtenue pour l'isotetrandrine à la

dose de 60 mg/kg/jour, et pour la limacine et la pheanthine aux doses de 10 mg/kg/jour. La dose pour le benznidazole pendant 10 jours était de 25 mg/kg/jour.

1.3. Les maladies d'origine bactérienne et fongique

Les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* du groupe A de Lansfield et *Klebsiella pneumoniae* sont les principaux agents responsables en Bolivie des affections du système respiratoire; en 1996 ont été recensés 43.209 cas aigus parmi les enfants en dessous de 5 ans. Les bactéries *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Shigella disenteriae*, *Yersinia*, *Vibrio cholerae* et *Proteus sp* ont été responsables en Bolivie la même année de 232168 cas aigus de diarrhée parmi la population infantile de moins de 5 ans.

Les champignons filamenteux pathogènes et les levures sont considérés comme la cause de nombreuses dermatoses sans caractère épidémique en Bolivie.¹

1.3.1. Chimiothérapie antibactérienne

Les différences biochimiques des divers micro-organismes définissent la recherche des médicaments bactéricides.⁴²

Le métabolisme des micro-organismes comporte trois étapes ou phases:⁴²

-phase I, génération d'énergie (ATP) à partir du glucose, et promotion de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques basiques précurseurs de la phase II. Cette biosynthèse est commune à toute cellule, d'où un manque d'intérêt pour la recherche de molécules qui puissent interférer avec celle-ci.

-phase II, dans cette phase, la biosynthèse des bases est accomplie. Elles serviront à la polymérisation de l'ADN et l'ARN dans la phase suivante. Cette phase est beaucoup plus sélective car le paramètre important est la biosynthèse du folate dans les bactéries, qui est ultérieurement utilisé dans la synthèse de l'ADN. Le folate est utilisé dans la génération de l'ADN chez l'homme, néanmoins l'homme peut aussi l'obtenir alternativement de l'alimentation. Les composés qui inhibent la biosynthèse des folates ont donc une action spécifique sur les bactéries sans provoquer des modifications majeures du métabolisme des folates chez l'homme (apport exogène). Cette inhibition peut être étendue à des protozoaires comme *Plasmodium*.

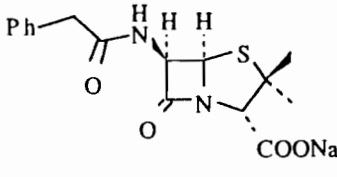
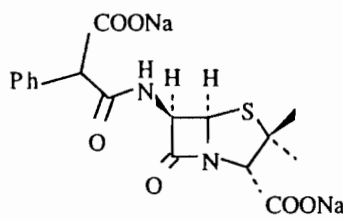
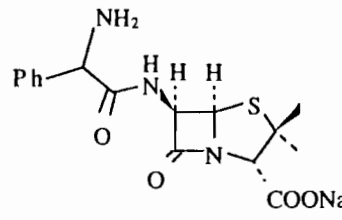
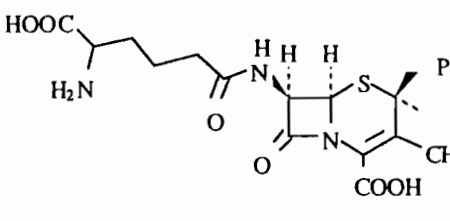
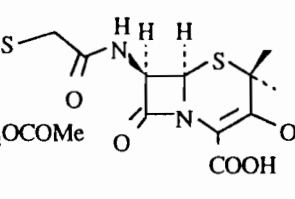
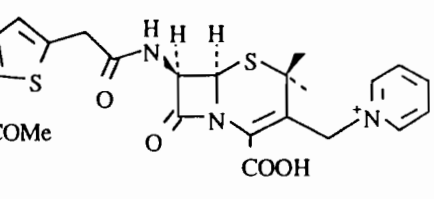
-phase III, dans cette phase du métabolisme des micro-organismes, se réalise la synthèse de macromolécules: biosynthèse du peptidoglycane composant principal de la paroi bactérienne et polymérisation de l'ADN et l'ARN.

Les phases II et III sont les cibles les plus usuelles des composés antibactériens en particulier dans le cas des entéro-bactéries pathogènes. Il en est de même pour *Plasmodium*. Certains micro-organismes possèdent des voies métaboliques qui sont identiques ou très similaires, ce qui fait penser qu'un bon antibactérien peut être indicatif d'une éventuelle activité antipaludique. Il semble ainsi possible d'après les résultats du criblage bactériologique, d'utiliser des molécules ou des extraits antibactériens pour les sélectionner dans les tests antipaludiques sur *Plasmodium*.

Il existe de nombreuses familles d'antibiotiques dont les principales sont:

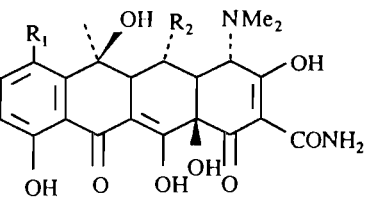
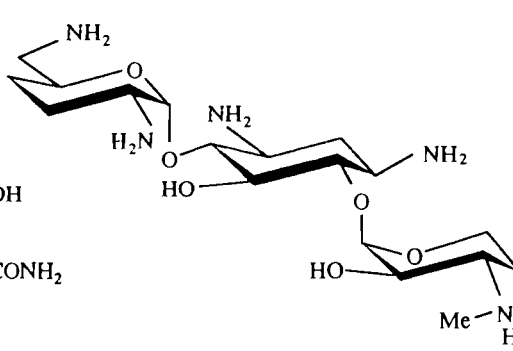
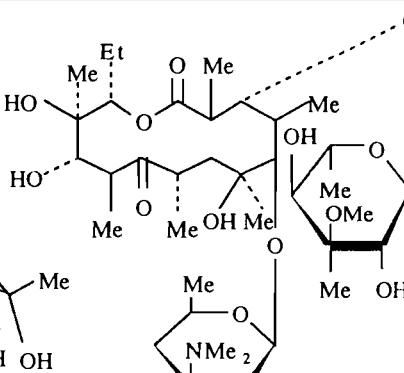
- les bétalactamines, dont les pénicillines et leurs dérivés, et les céphalosporines, (Tableau 9)
- les tétracyclines, les aminosides et les macrolides, (Tableau 10)
- les phénicolés, les sulfamides et d'autres divers: triméthoprim, acriflavine, quinolones (Tableau 11).

Tableau 9. Antibiotiques bétalactaminiques

Penicillines		
		
penicilline G sodique ^a	carbenicilline disodique ^a	ampicilline sodique ^b
Céphalosporines		
		
cephalosporine C ^a	cephalapirine ^c	cephaloridine ^c

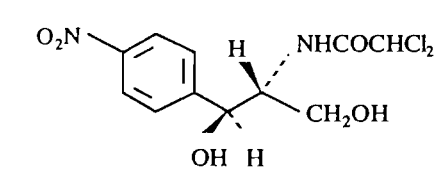
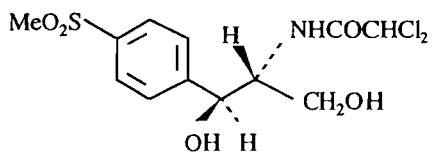
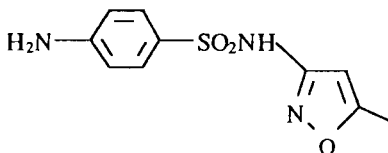
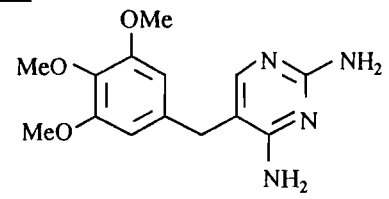
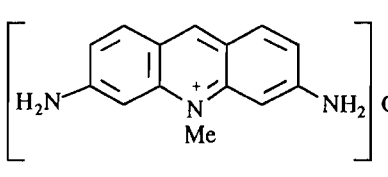
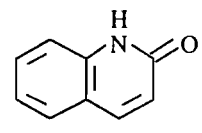
a: action sur la phase III;⁴³ b: action sur la phase II;⁴³ c: ⁴⁴

Tableau 10. Antibiotiques: Tetracyclines, Aminosides et Macrolides

Tetracyclines ^c	Aminosides ^c	Macrolides ^c
 tetracycline $R_1=R_2=H$ chlortetracycline $R_1=Cl, R_2=H$ oxytetracycline $R_1=H, R_2=OH$	 gentamicine C 1a^d	 Erythromycine OH

c; ⁴⁴ d: action sur la phase II⁴³

Tableau 11. Antibiotiques: Phénicolés, Sulfamides et divers

Phénicolés	Sulfamides
 chloramphénicol^e  thiamphénicol^e	 Sulfamethoxazole^e
Divers	
 trimethoprim^f	 chlorhydrate d'acriflavine^e  quinolone

e: action sur la phase III;⁴³ f: action sur la phase II⁴³

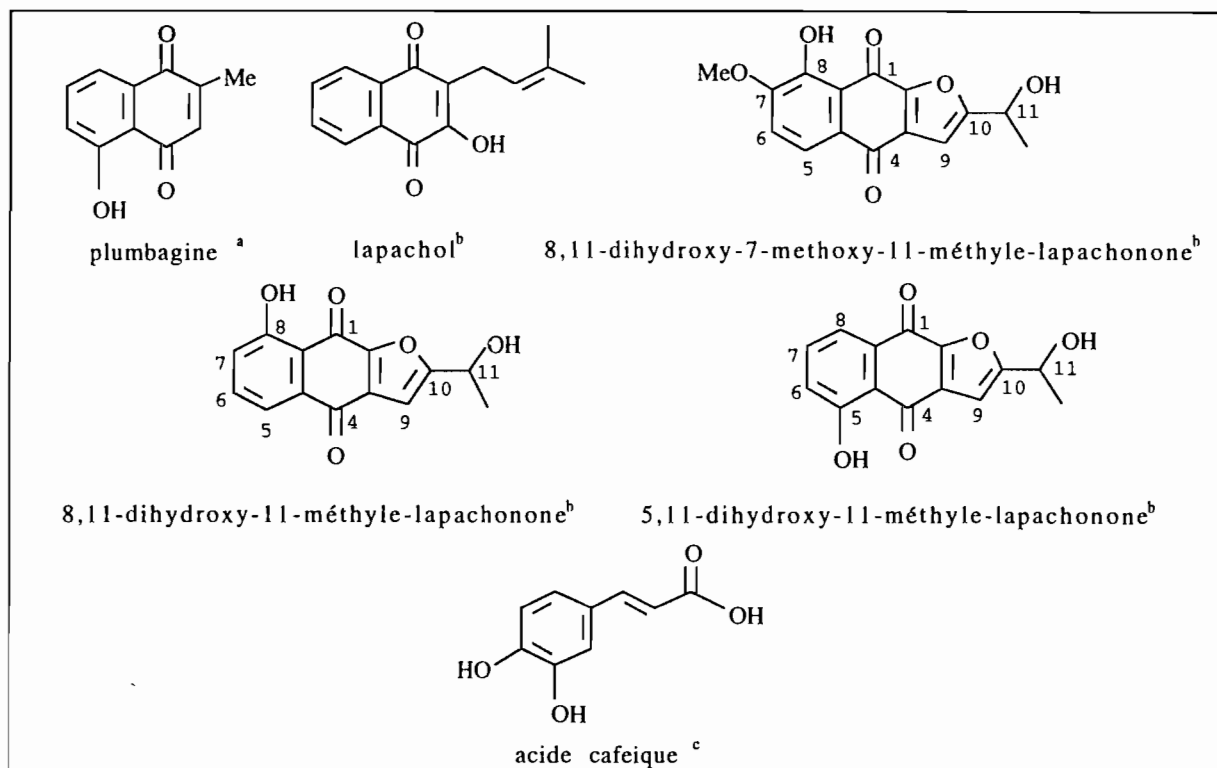
L'utilisation excessive d'un antibiotique provoque une chimiorésistance chez la bactérie. Cette résistance peut être le résultat de plusieurs causes biochimiques qui sont:

- la transformation de la molécule d'antibiotique en une forme inactive. Cette transformation s'effectue par les enzymes bactériennes (peptidases comme les β -lactamases, transférases) qui sont inhérentes à la bactérie ou induites par l'antibiotique,
- la modification du site cible de l'antibiotique par production d'un récepteur protéique modifié,
- la modification de la perméabilité de la bactérie à l'antibiotique par altération de la protéine transporteuse de l'antibiotique,
- la production accrue de l'enzyme inhibée par l'antibiotique.

La résistance est transmise entre bactéries à travers des gènes modifiés et des plasmides, ou de plasmides entre la bactérie et l'organisme dans lequel elle se trouve.

Les métabolites secondaires des végétaux supérieurs, constituent une source importante de nouvelles structures actives contre les bactéries grâce à la variété structurale qu'ils présentent. L'Institut de Recherches Pharmaco-Biochimiques de l'Université San Andrés à La Paz (IIFB) a réalisé des essais sur de nouveaux composés anti-bactériens comme des quinones: la plumbagine, le lapachol, et l'acide caféique (Tableau 12).

Tableau 12. *Antibactériens naturels isolés de plantes boliviennes*



a: de *Plumbago coerulea* et *Pera benensis*; active contre des bactéries à gram (+) et gram (-);⁴⁵ b: de *Tabebuia serratifolia*; actifs contre des bactéries à gram(+);⁴⁶ c: de *Lepechinia floribunda*, actif contre des bactéries à gram (+)⁴⁷

I.3.2. Chimiothérapie antifongique

Les champignons sont les causes de certaines maladies et de certaines contaminations saprophytes. Parmi les 50000 à 200000 espèces de champignons connues, seules 100 espèces sont reconnues comme causes primaires de maladies d'origine mycosique chez l'homme, et responsables de moisissures qui envahissent et parasitent les aliments et les cultures de laboratoires comme c'est le cas pour *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*.

Les maladies provoquées par les champignons⁴⁸ peuvent être classées en: mycoses superficielles (peau, phanères), mycoses subcutanées (muqueuses) et mycoses profondes ou systémiques (organes). Les mycoses superficielles de la peau sont provoquées principalement par des dermatophytes (*Micromonospermum*, *Trichophyton*, *Pityriasis*) et des levures (*Candida*). Certaines peuvent comporter de graves conséquences pour la santé. Le pied d'athlète provoqué par *Trichophyton mentagrophytes*, est l'infection fongique la plus commune mais n'est pas aussi invalidante que l'aspergillose, l'actinomycose, l'histoplasmosse ou la coccidioidomycose qui affectent environ 100 millions de personnes aux Etats Unis.⁴⁹

Le traitement des mycoses est topique ou systémique. Pour les traitements topiques, les traitements traditionnels à base de solutions d'iode dans des acides tels que l'acide salicylique, l'acide undécylonéique, l'acide borique ou l'acide benzoïque, sont toujours utilisées. Avec l'avènement de la griséofulvine (Tableau 13), a commencé la recherche de nouveaux antifongiques plus performants surtout au niveau systémique et pour le traitement des cas de décoloration de la peau et des ongles qui auparavant n'avaient pas de thérapie effective.

Les principaux antifongiques naturels sont présentés dans le Tableau 13:

- l'amphotéricine B (*Fungizone*®) isolée de *Streptomyces nodosus*
- la griséofulvine (*Fulvine Forte*®) de *Penicillium griseofulvum*
- la nystatine (*Mycostatine*®) de *S. noursei*

Les antifongiques synthétiques⁵⁰ et plus particulièrement les dérivés imidazoles du Tableau 14:

- le miconazole (*Daktarin*®),
- le kétoconazole (*Nizoral*®),
- l'itraconazole (*Sporanox*®),
- le clotrimazole (*Lotrimin*®)
- l'éconazole (*Ecostatin*®).
- le tolnaftate (*Sporiline*®).

En général ils présentent le double désavantage d'une hydrosolubilité faible et d'une toxicité variable aux doses thérapeutiques. Communément, ce sont des agents topiques qui possèdent l'avantage d'un spectre d'action étendu en agissant comme antifongique, antilevure et anti-bactérien, malgré leur propriété d'engendrer des réactions d'hypersensibilité avec manifestations allergiques.

Tableau 13. *Antifongiques naturels*

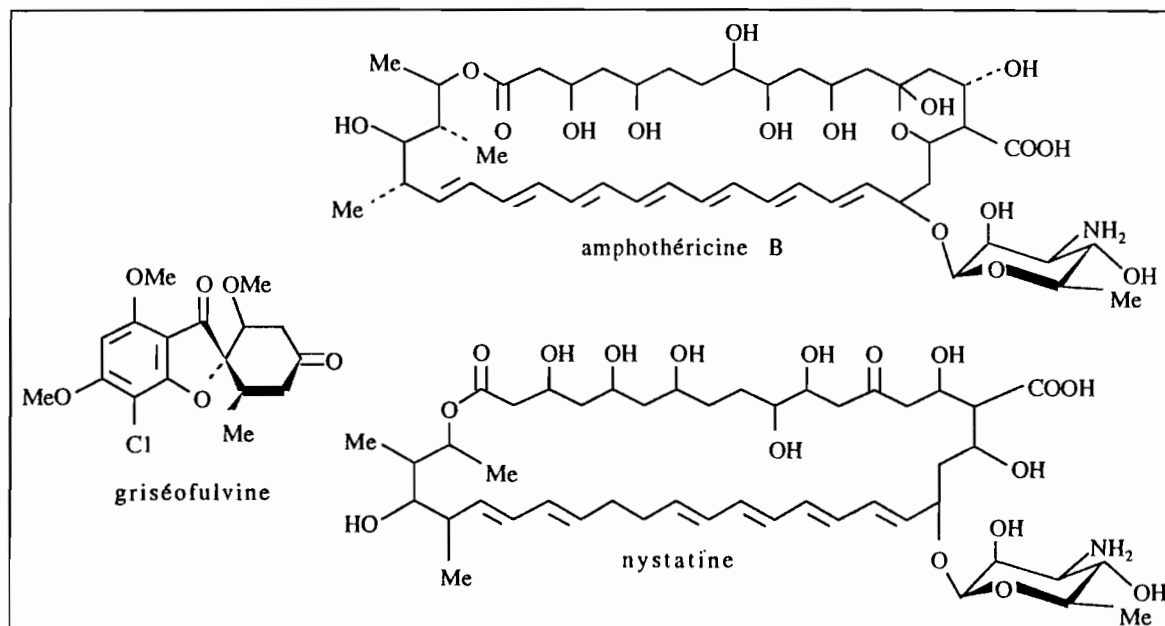
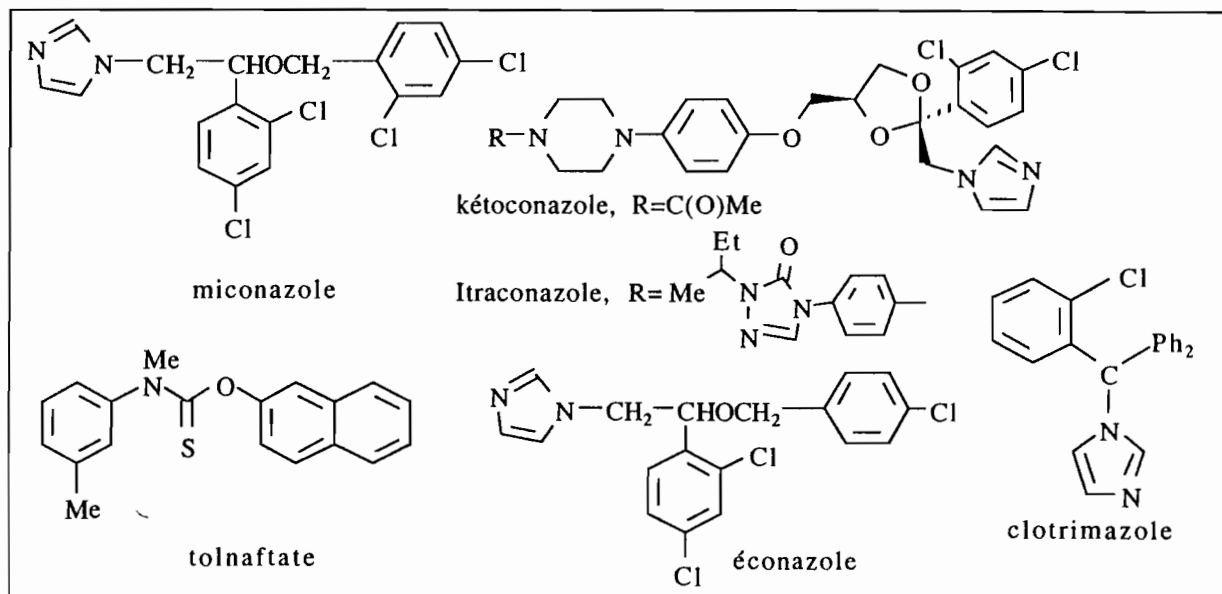


Tableau 14. *Antifongiques synthétiques*



Les extraits des végétaux supérieurs présentant une activité fongicide, sont une source alternative importante pour la découverte de nouveaux antifongiques naturels. Les esters de l'acide caféique⁵¹ montrent une activité *in vitro* inhibitrice sur des champignons et des bactéries phytopathogènes. Les phytoalexines malgré l'énorme quantité d'études réalisées due à leur activité contre des phytopathogènes fongiques, ont été très peu étudiées quant à leur activité contre des pathogènes fongiques des animaux.⁵² Apparemment, les phytoalexines présentent une activité de l'ordre de 10-100 µg/ml sur une gamme étendue d'espèces de champignons. En fait, leur non-spécificité peut réduire considérablement leur application en médecine. Malgré leur faible activité par rapport à celle des antibiotiques utilisés aujourd'hui, le rôle potentiel de ces composés comme modèles d'antifongiques⁴⁹ peut être réexaminé étant donné la faible quantité de fongicides disponibles dans l'arsenal thérapeutique.

II. DEUXIÈME PARTIE

BOTANIQUE, ETHNOPHARMACOLOGIE, EXTRACTION DES
ESPÈCES ÉTUDIÉES

II.1. Introduction

Cette partie du travail concerne l'étude phytochimique par bioguidage de six espèces végétales boliviennes. Nous donnerons une description botanique sommaire et des renseignements ethnopharmacologiques pour chacune de ces espèces, avant de discuter l'obtention d'extraits à partir de chaque plante au moyen de solvants de polarités appropriées. Les indices d'activité biologique issus des essais antiparasitaires, antibactériens et antifongiques pratiqués sur chaque extrait ont été mesurés comme critère pour la poursuite des recherches sur la composition chimique des extraits.

L'étude des six espèces végétales sera exposée dans l'ordre suivant:

- Plante provenant des hauts plateaux de Potosí:
 1. *Senecio smithioides*, (Asteraceae)
- Plantes provenant de l'ethnie Chácobo:
 2. *Amburana cearensis* (Fabaceae)
 3. *Qualea paraensis* (Vochysiaceae)
- Plantes provenant de l'ethnie des Raqaypampeños:
 4. *Dunalia brachyacantha* (Solanaceae)
 5. *Notholaena nivea* var. *flava* (Pteridaceae)
- Plante provenant de l'ethnie Tacana:
 6. *Cavanillesia* aff. *hylogeiton* (Bombacaceae)

Les dessins des plantes présentés correspondent à des échantillons d'herbier déposés à l'Herbier National de Bolivie de l'Université San Andrés de La Paz. Le matériel végétal a été récolté par le Lic. Hugo Arando (*Senecio smithioides*), Dr. Sylvie Bergeron (*Amburana cearensis*, *Qualea paraensis*), Dr. Geneviève Bourdy (*Dunalia brachyacantha*, *Cavanillesia* aff. *hylogeiton*) et Lic. Susana Arrazola et Lic. Edwin Saravia (*Notholaena nivea* var. *flava*).

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. Ce type de choix fait partie intégrante de la méthodologie du projet de recherche sur les substances naturelles à activité antiparasitaire, antibactérienne et antifongique. Ce projet a été mené par l'Institut de Recherches Chimiques (IIQ), l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude (IBBA) et l'Institut de Recherches Pharmaco-Biochimiques (IIFB) de l'Université San Andrés de La Paz, et d'autre part par l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD ex ORSTOM).

Le type de symptôme rapporté dans l'enquête pharmacologique renseigne sur l'activité biologique associée à l'espèce étudiée. Ainsi nous savons que:

- la fièvre implique une évaluation d'activité sur le paludisme,
- les affections cutanées nécessitent des évaluations d'activités sur les leishmanioses, les champignons et les bactéries,
- les troubles digestifs et broncho-pulmonaires, indiquent des évaluations sur les bactéries.

Certaines voies métaboliques sont communes entre parasites et microorganismes, comme la voie de synthèse de l'ergostérol des membranes qui est identique dans le genre *Leishmania* et chez les levures. L'amphotéricine B qui inhibe cette synthèse a un double usage thérapeutique dans les candidoses systémiques et les leishmanioses résistantes aux antimonies. On peut faire le même type de parallélisme pour certaines voies métaboliques entre *Plasmodium* et les bactéries. Un effet positif sur un extrait antifongique impose donc un essai de ce même extrait sur les parasites de la leishmaniose si les quantités disponibles sont suffisantes (de même pour les drogues bactéricides qui sont testées sur *Plasmodium*).

Les essais biologiques antiprotozoaires ont été réalisés au Laboratoire de Pharmacognosie de l'IRD à l'IBBA tandis que les essais antibactériens et antifongiques ont été réalisés par l'IIFB de l'Université Majeure de San Andrés de La Paz (UMSA). Les travaux de chimie extractive et structurale ont été réalisés au Laboratoire de pharmacognosie de Reims, et en Bolivie à l'IBBA et à l'IIQ (UMSA).

Le critère pour sélectionner les extraits les plus actifs dans le guidage biologique sont:

-pour le paludisme, deux méthodes ont été utilisées alternativement pour obtenir le meilleur rapport entre le nombre de tests à exécuter et l'information utile que l'on peut extraire des résultats, les tests biologiques étant particulièrement délicats à mettre en œuvre et coûteux:

a) La première méthode consiste à fixer une dose d'extrait unique qui doit inhiber la croissance de la culture de *Plasmodium*. Cette dose est choisie en fonction de la concentration moyenne supposée du principe actif qui est estimé entre 0,1 et 1% du poids sec de la plante. Les doses d'extrait présentes dans un ml de milieu de culture varient donc entre 10 et 100 microgrammes.

b) Dans la deuxième méthode, on détermine la CI_{50} qui est la dose d'extrait qui inhibe 50% de la multiplication cellulaire. Trois concentrations décroissantes sont nécessaires au minimum pour établir la courbe effet-dose.

On considère que l'activité antipaludique est très bonne quand la CI_{50} est égale ou inférieure à 1 $\mu\text{g/ml}$, bonne si elle est entre 1 et 5 $\mu\text{g/ml}$, et moyenne si elle supérieure à 5 et inférieure à 10 $\mu\text{g/ml}$. Une CI_{50} égale ou supérieure à 10 $\mu\text{g/ml}$ indique que la substance testée ne possède pas d'activité antipaludique.

-pour les leishmanioses et la maladie de Chagas:

l'extrait sélectionné provoque la lyse totale des parasites à la plus basse concentration.

-pour les bactéries et champignons:

l'extrait choisi donne le halo d'inhibition le plus grand dans la boîte de Pétri à la plus basse concentration.

II.2. Senecio smithioides, Cabrera (Asteraceae).

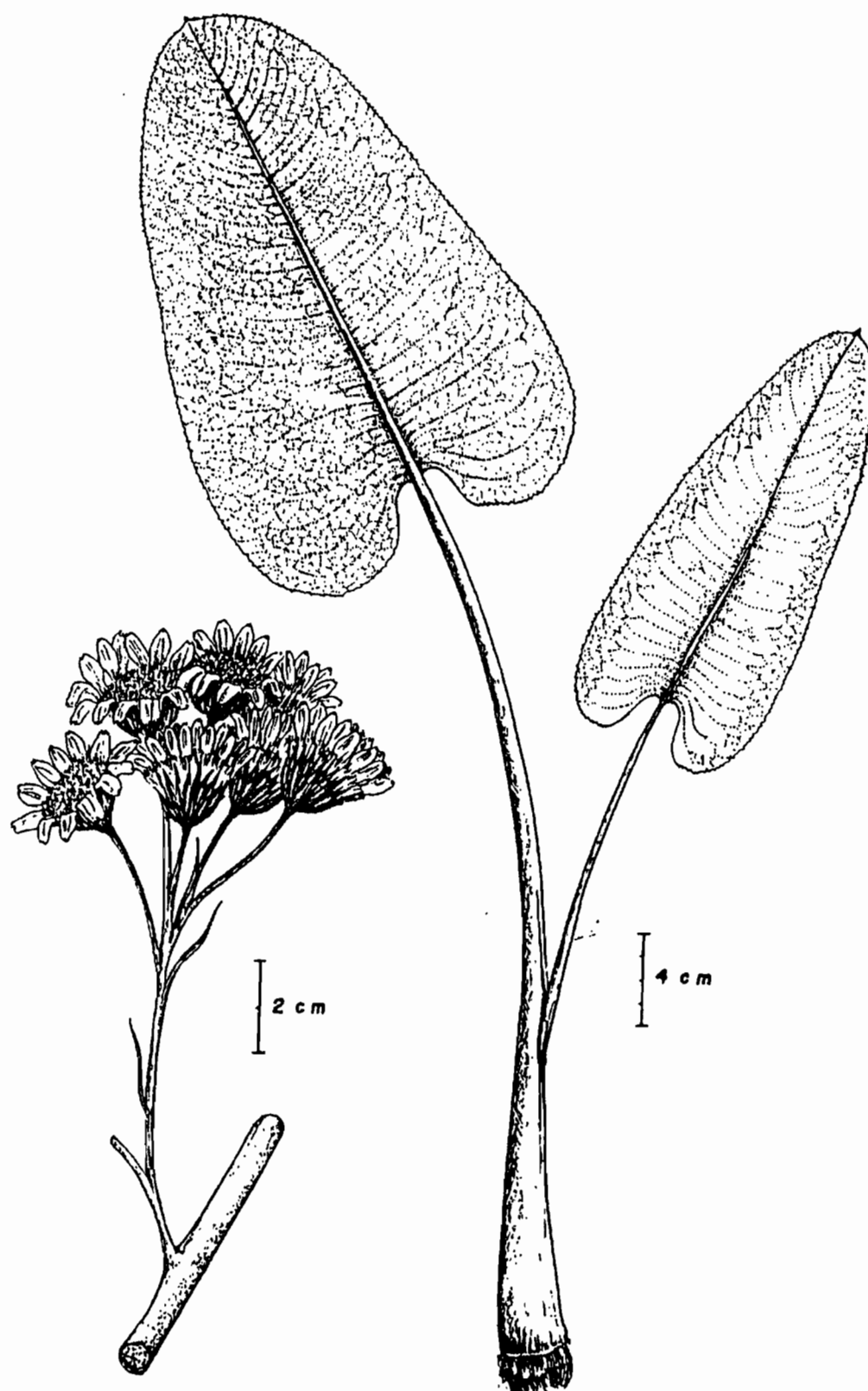


Figure 5. *Senecio smithioides*⁵³ Cabrera

II.2.1. Présentation botanique et ethnopharmacologique

*Senecio smithioides*⁵³ Cabrera (Asteraceae) est une grande plante herbacée, pouvant atteindre 2 m et demi de hauteur. Les feuilles peuvent atteindre la taille de 30 cm X 10 cm, sont denticulées, et le pétiole est longuement engainant. Les jeunes feuilles présentent un duvet tomenteux, blanc. Les fleurs sont ligulées, aux pétales blancs et aux tubules jaunes. Cette herbacée est rencontrée généralement près des endroits marécageux ou des retenues d'eau. En Bolivie, son habitat se situe dans les vallées interandines, entre 3000 et 1500m. L'utilisation en médecine traditionnelle par la population Quechua du nord du département de Potosi est rapportée pour des maladies telles que le rougeole, le choléra, la goutte, les rhumatismes, les calculs rénaux et biliaires, et comme anti-inflammatoire. Elle est aussi utilisée comme cicatrisante. L'utilisation en médecine traditionnelle du genre *Senecio* est aussi très variée et très répandue.

II.2.2. Extraction

Les feuilles sèches et broyées de *S. smithioides*, sont mises à macérer successivement dans des solvants de polarité croissante: éther de pétrole, CH_2Cl_2 , AcOEt et EtOH 95° (Schéma 2).

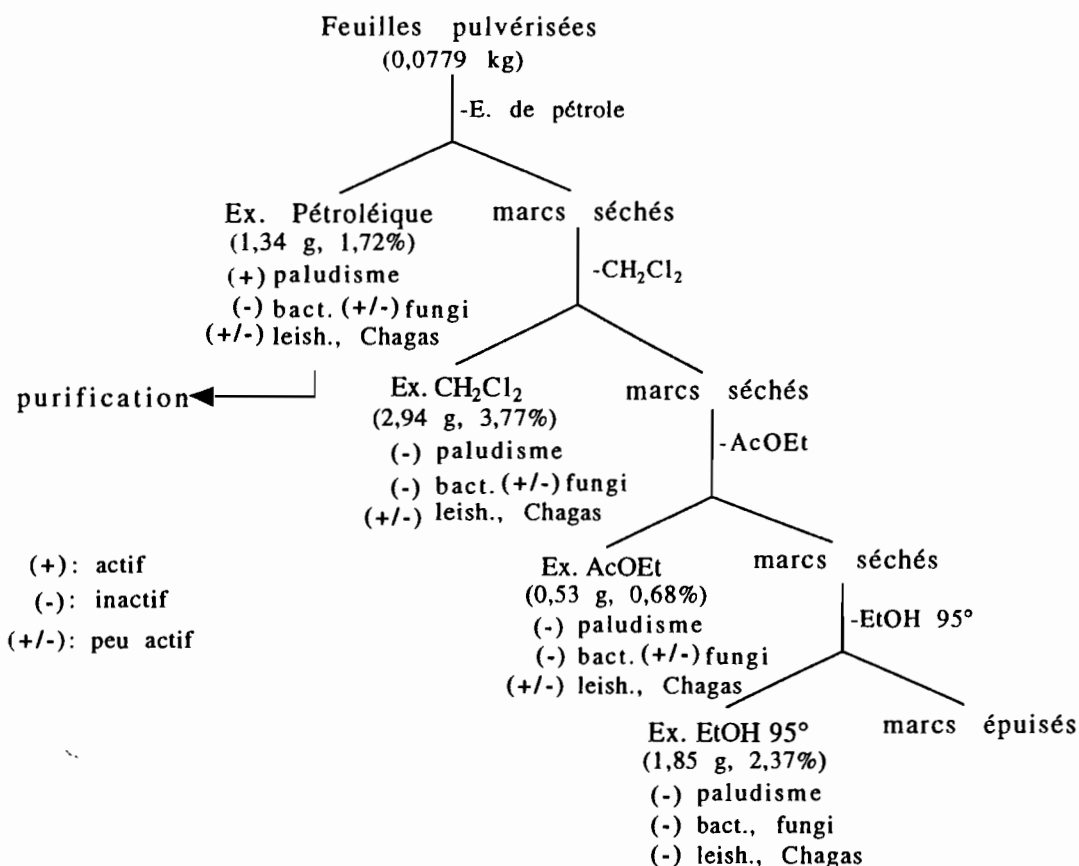


Schéma 2. Extraction à partir des feuilles de *S. smithioides*

Tableau 15. Résultats des tests antiprotozoaires des extraits de *S. smithioides*

Extrait	Conc. ‡	Souches*				
		T.c. §	L.b. §	L.a. §	L.d. §	P.f.
Éther de pétrole	CI ₅₀					< 1‡
	100	+	+++	+++	+++	
	10	0	+	+	+	
CH ₂ Cl ₂	100	+	+++	+++	+++	
	10	0	0	0	0	
AcOEt	100	+	+++	+++	+++	
	10	0	0	0	0	
EtOH	100	0	0	0	0	

* Tc = *Trypanosoma cruzi*, La = *Leishmania amazonensis*; Lb = *Leishmania braziliensis*; Ld = *Leishmania donovani*; Pf = *Plasmodium falciparum*; ‡ en µg/ml; § 0= Nombre d'épimastigotes ou promastigotes identique au contrôle; += 75% épimastigotes ou promastigotes, avec peu de formes dégénératives; ++= 50% épimastigotes ou promastigotes, avec peu de formes dégénératives; +++= lyse totale des parasites

L'extrait éthero-pétroléique possède une CI₅₀ < 1 µg/ml sur une souche sensible à la chloroquine de *P. falciparum*. Cet extrait manifeste une activité antileishmanienne intéressante avec une lyse totale des parasites à 100 µg/ml, la lyse est de 25% à la dose de 10 µg/ml, cet extrait sera donc retenu pour des essais de fractionnement ultérieurs. Les extraits CH₂Cl₂ et AcOEt présentent également une lyse totale des promastigotes à 100 µg/ml, mais cette activité disparaît à la concentration à 10 µg/ml. Ils ne seront pas retenus pour des recherches de principes actifs.

L'activité antichagassique des extraits éther de pétrole, CH₂Cl₂ et AcOEt n'est pas importante et elle a été faiblement démontrée avec l'élimination de 25% des formes épimastigotes à la dose de 100 µg/ml. L'extrait éthanolique n'a manifesté aucune activité (Tableau 15).

Seul, l'extrait éthero-pétroléique a été choisi parmi tous les extraits pour une purification ultérieure.

L'activité sur des bactéries gram (+), (*Staphylococcus aureus*) n'est pas remarquable avec un halo d'inhibition sur boîte de Pétri d'à peine 2 mm, 4 mm et 5 mm à 10 mg/ml, respectivement pour les extraits à l'éther de pétrole, l'AcOEt et l'EtOH. L'activité contre les bactéries gram (-) (*Escherichia coli*) est nulle. L'activité antifongique est un peu plus importante que celle obtenue contre les bactéries à gram (+) avec 14 mm (extrait pétroléique), 12 mm (extrait CH₂Cl₂) et 14 mm (extrait AcOEt) de halo d'inhibition à 8 mg/ml sur *Neurospora crassa*. L'activité contre *Candida albicans* est nulle (Tableau 16).

Tableau 16. *Résultats des tests antimicrobiens des extraits de S. smithioides*

Extrait	Conc. ‡	Espèces*			
		<i>S.a.</i> §	<i>E.c.</i> §	<i>N.c.</i> §	<i>C.a.</i> §
Éther de pétrole	10	-	-	+/-	-
CH ₂ Cl ₂	10	-	-	+/-	-
AcOEt	10	-	-	+/-	-
EtOH	10	-	-	-	-

* *Sa* = *Staphylococcus aureus*, *Ec* = *Escherichia coli*; *Nc* = *Neurospora crassa*; *Ca* = *Candida albicans*; ‡ en mg/ml

II.3. *Amburana cearensis*, A. C. Smith (Fabaceae).

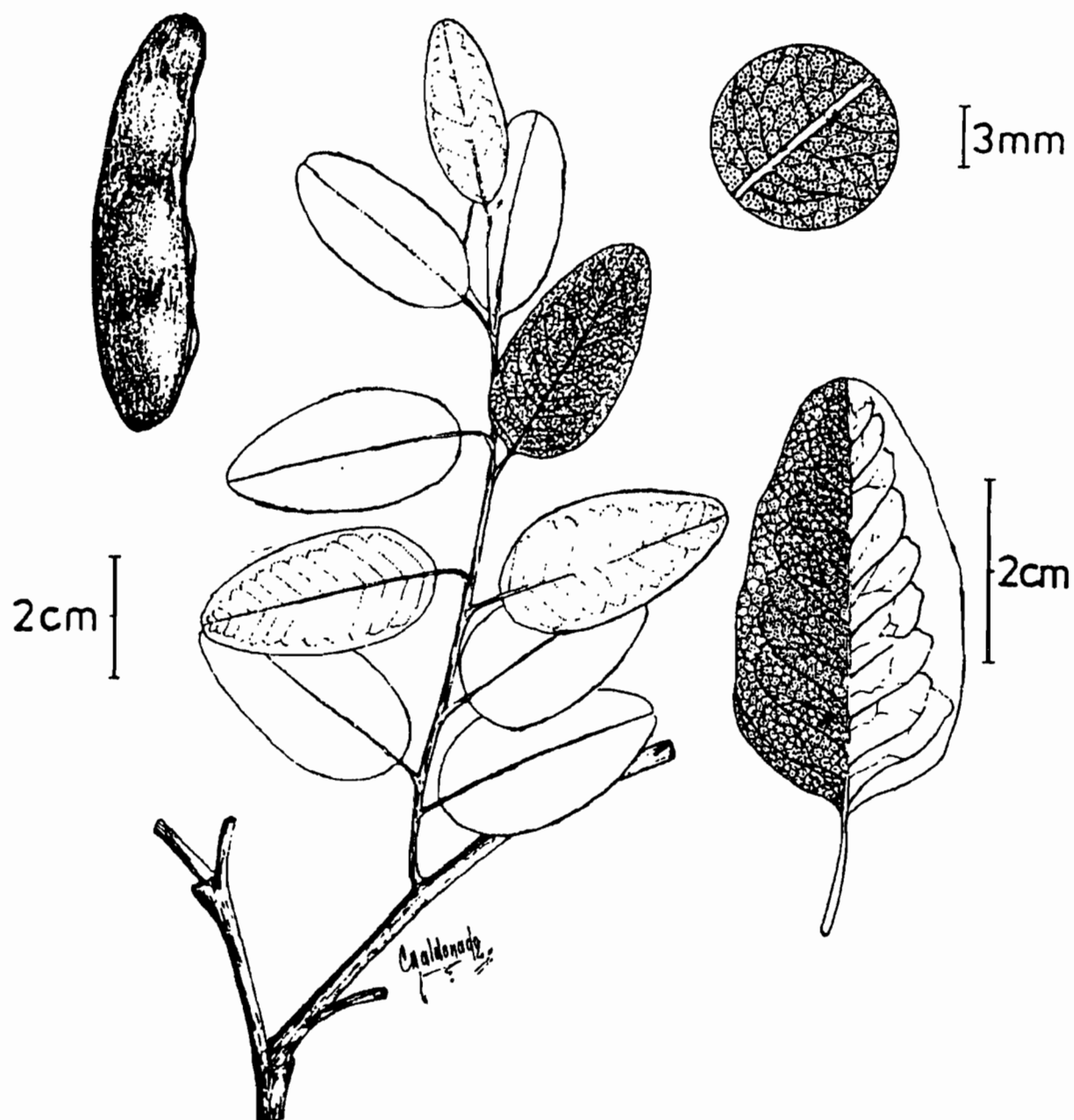


Figure 6. *Amburana cearensis*⁵⁴ (Allemao) A. C. Smith

II.3.1. Présentation botanique et ethnopharmacologique

*Amburana cearensis*⁵⁴ (Allemão), A. C. Smith (Fabaceae) est un grand arbre pouvant atteindre 40 m de haut à écorce lisse, rougeâtre, aromatique, de couleur marron-orangée, et qui se décolle par plaques papiracées avec exsudation d'une gomme jaunâtre. Les feuilles sont imparipennées, avec des folioles alternes. Les fleurs sont disposées en cime axillaire ou terminale; elles sont sessiles, le calice est tubulaire, les dix étamines sont libres. Le fruit est une gousse oblongue, déhiscence, avec une graine distale, ailée, dispersée par le vent, apparaissant en octobre. La délimitation taxonomique de l'espèce reste encore mal définie, et peu d'études ont été réalisées sur son écologie et sa reproduction. Cette espèce se rencontre en forêt humide, de plaine ou de montagne, ou en forêt semi-caducue.

A. cearensis est aussi appelée en Bolivie "tumi", "sorioco" et "roble" dans les départements du Beni, de La Paz et de Santa Cruz.

Le bois de *A. cearensis* est utilisé en menuiserie, et en ébénisterie fine, sous forme de planches et en parquet. En Bolivie, c'est un des bois les plus exploités commercialement et est soumis à une exploitation industrielle intensive. *A. cearensis* est la troisième espèce utilisée par rang d'importance après *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) et *Cedrela odorata* (Meliaceae).

A. cearensis est une espèce assez abondante en Bolivie, qui est également connue comme plante médicinale aux nombreuses propriétés. Elle a été signalée par les membres de l'ethnie Chácobo pour le traitement des symptômes qui peuvent être en relation avec une attaque de paludisme: fièvre, problèmes hépatiques, troubles digestifs, vomissements et céphalées.^{55,56} La drogue est préparée par décoction des écorces de tronc dans l'eau et administrée par voie orale.⁵⁶ Les Tacanas, ethnie amazonienne du nord de la Bolivie, utilisent aussi l'écorce de cette espèce appelée localement "Dherequi", sous forme de décocté pour soigner les spasmes intestinaux, accompagnés ou non de diarrhée. De la même manière l'écorce en décoction sert à soigner les douleurs lombaires, car elle aurait des propriétés antispasmodiques, et relaxantes. Dans cette même ethnie, on prépare des bains, l'écorce étant longuement bouillie dans une grande quantité d'eau; une fois tiède ce bain est administré aux enfants malades. Enfin, les arômes dégagés par l'écorce de cette espèce servent à parfumer les feuilles de tabac et à leur donner une saveur douce.¹¹ L'écorce de cette espèce est aussi utilisée au Brésil (dans l'état de l'acre) pour préparer un sirop contre la grippe et la toux. Les graines auraient des propriétés analgésiques et sont appliquées moulues sur les gencives douloureuses.⁵⁷

II.3.2.Extraction

L'extrait hydroalcoolique à 30% d'eau des écorces de tronc de *A. cearensis*, avait montré une inhibition de 84 % de la parasitémie de *Plasmodium falciparum* (méthode *in vitro*) lors de la réalisation du criblage pharmacologique des plantes provenant de l'ethnie Chácobo fait à l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude.⁷ D'autre part, ce même extrait inhibe respectivement à 96% et 81% la croissance des souches de *P. berghei* et *P. vinckei* lorsqu'il est administré à la dose de 1000 mg/kg/jour et de 250 mg/kg/jour (méthode *in vivo*).⁷

Les écorces de tronc de *A. cearensis* ont été broyées et un fractionnement a été accompli au moyen de solvants à polarité croissante. Des extractions solide-liquide successives en Soxhlet ont été réalisées (Schéma 3) afin d'obtenir les extraits à l'éther de pétrole, au CH_2Cl_2 , à l'AcOEt et à l'EtOH 95°.

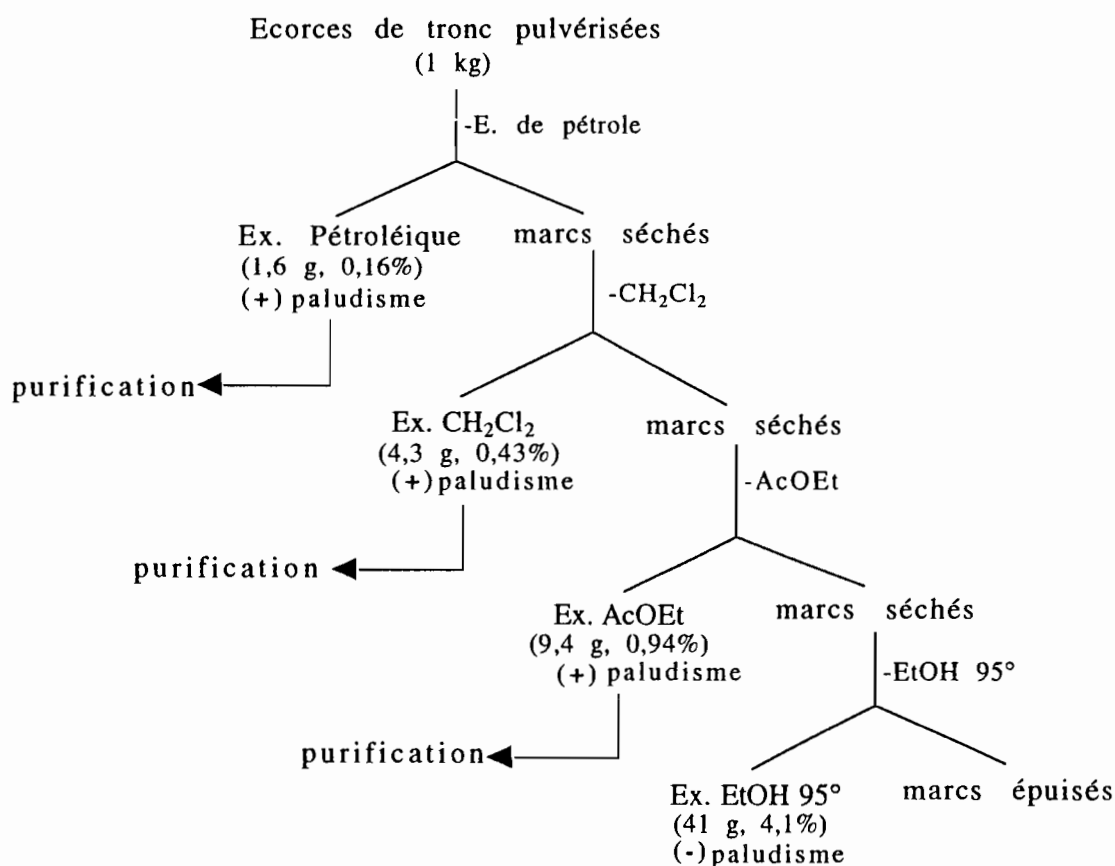


Schéma 3. Extraction des écorces de tronc d'*A. cearensis*

Les essais antipaludiques *in vitro* et *in vivo* sur ces extraits ont été ensuite réalisés. L'extrait d'éther de pétrole a montré 70 et 47% d'inhibition de *P. falciparum* à 100 et 10 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau 17). Les extraits

CH₂Cl₂, AcOEt et EtOH 95° ont été évalués *in vitro* contre des souches de *P. falciparum* chloroquinosensibles et ont montré les pourcentages d'inhibition respectifs suivants: 96 et 63, 87 et 27, et 65 et 18% (à 100 et 10 µg/ml, Tableau 17). Les extraits au CH₂Cl₂ et à l'AcOEt ont fait l'objet d'un fractionnement bioguidé en vue de purifier les composés responsables de l'activité. L'extrait EtOH 95° ne présente pas un intérêt du point de vue biologique, et n'a pas fait l'objet d'une analyse chimique approfondie.

Tableau 17. Résultats des tests antipaludiques des extraits de *A. cearensis*

Extrait	Espèces*			
	Conc.‡	<i>Pf</i> % d'inhibition	<i>Pb</i> % d'inhibition	<i>Pv</i>
Ether de Pétrole†	100	70		
	10	47		
CH ₂ Cl ₂ †	100	96		
	10	63		
AcOEt†	100	87		
	10	27		
EtOH 95°	250§		96	
	250§			81
	100‡	65		
	10‡	18		

**Pf* = *Plasmodium falciparum*, *Pb* = *Plasmodium berghei*, *Pv* = *Plasmodium vinckei*; ‡: en µg/ml; §: en mg/kg/jour; † non testé pour *Pb* ni *Pv*

II.4. Qualea paraensis, Ducke (Vochysiaceae).



Figure 7. *Qualea paraensis*⁵⁴ Ducke

II.4.1. Présentation botanique et ethnopharmacologique

*Qualea paraensis*⁵⁴ Ducke (Vochysiaceae) est un arbre de la forêt amazonienne non inondable pouvant atteindre 35 m. Les feuilles sont coriaces, luisantes, aux nervures secondaires toutes parallèles entre elles. L'écorce externe est lisse, dure, avec de petites écailles; celle située sur les jeunes rameaux est légèrement exfoliante. L'écorce interne est de couleur brique. La floraison de cette espèce a lieu de septembre à février.

L'utilisation des espèces du genre *Qualea* est très diversifiée. Dans la région de Mitú au nord-est de l'Amazonie sud-américaine, *Q. acuminata* est utilisée en infusion pour le traitement du taenia. Les Makunas, utilisent cette espèce pour traiter les "aires blanches" qui peuvent être assimilées à des infections fongiques (candidoses interdigitales) des doigts, en appliquant des feuilles fraîches sur les zones affectées de la peau et ainsi enlever la douleur. Dans la forêt, la plante est utilisée pour un usage médicinal alors que dans la savane on l'utilise comme combustible, bois de construction et pour divers usages.⁵⁸

Les écorces de tronc de *Q. paraensis* sont utilisées par les Chácobo (appelé en Chácobo: juhui sama) pour soulager les symptômes des éruptions cutanées et de la rougeole.⁵⁵ D'après l'information ethnobotanique et les essais antipaludiques *in vitro* préliminaires, *Q. paraensis* a été classée parmi les espèces médicinales Chácobo utilisées pour diminuer des symptômes en rapport indirect avec des maladies parasitaires. Au Brésil le bois sert à faire des bateaux, des rames, des caisses. Les fruits sont consommés par les chacobos.

Les écorces sèches de *Q. homosepala*, sont utilisées par des habitants de l'ethnie Karijonas de la région de Rio Vaupés en Colombie, pour l'obtention d'une poudre hémostatique.⁵⁹

II.4.2. Extraction

Les essais préliminaires pharmacologiques sur l'extrait hydroalcoolique à 30% révèlent une activité antipaludique significative selon les indices suivants: 88% d'inhibition de la croissance de *P. falciparum*, *in vitro* à la dose de 100 µg/ml, 68% d'inhibition de *P. vinckei in vivo* à la dose de 250 mg/kg/jour et 47% d'inhibition de *P. berghei in vivo* à la dose de 1g/kg/jour. Ces résultats ont suscité une analyse chimique biodirigée.

Après pulvérisation, les écorces de *Q. paraensis* ont été extraites à l'aide de solvants selon un protocole figuré sur le Schéma 4.

Un extrait brut a été obtenu par macération à température ambiante et en l'absence de lumière dans un mélange hydroalcoolique à 30% d'eau pendant huit semaines en soutirant la phase liquide chaque semaine et qui est ainsi renouvelée. Après concentration, l'extrait hydroéthanolique obtenu, a été soumis aux essais contre *P. falciparum* pour corroborer l'indice d'activité obtenu initialement. Le résidu hydroéthanolique dissous dans l'eau, est soumis à une extraction liquide-liquide avec le CH_2Cl_2 . La fraction aqueuse résultante s'est avérée être inactive et a été rejetée.

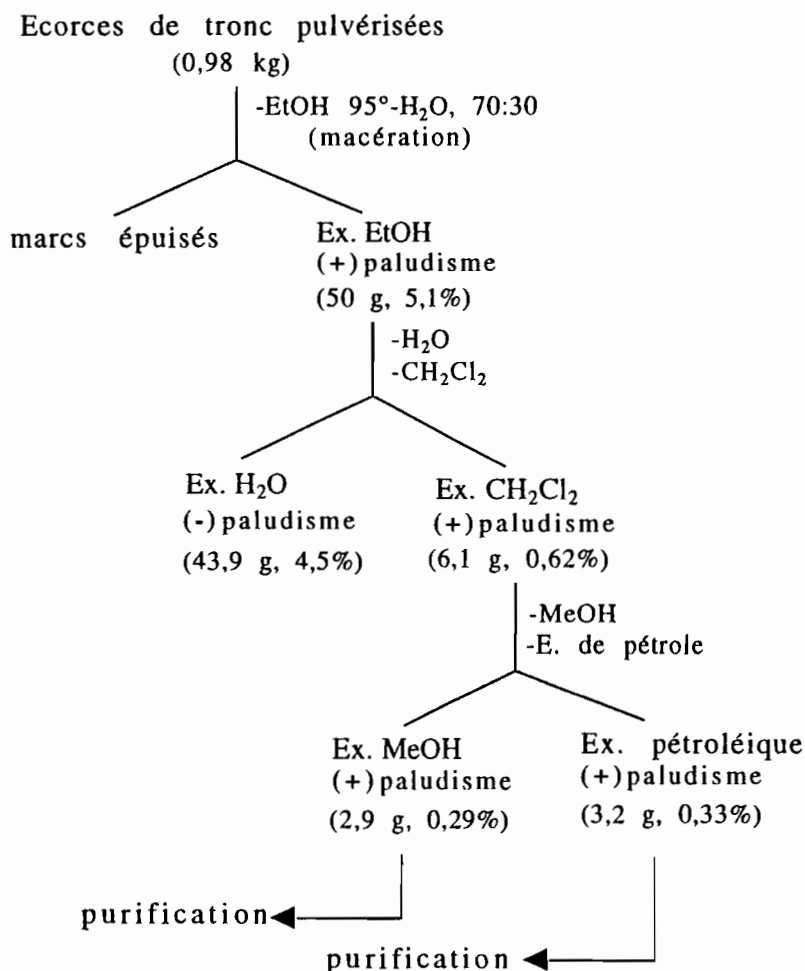


Schéma 4. Extraction des écorces de tronc de *Q. paraensis*

La fraction CH_2Cl_2 possédant les indices initiaux d'activité est conservée (88% d'inhibition de la parasitémie à la dose de 100 $\mu\text{g/ml}$).

Le résidu d'extraction au CH_2Cl_2 est ensuite dissous dans le mélange $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (90:10) et partagé par extraction liquide-liquide contre l'éther de pétrole (Schéma 4). Les essais antipaludiques sur *P.*

falciparum in vitro réalisés sur les deux phases laissent constater un partage de l'activité, CI_{50} de $4,2 \pm 0,8$ $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait pétroléique et CI_{50} de $1,7 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait hydrométhanolique sur une souche de *P. falciparum* chloroquinosensible.

Le Tableau 18 regroupe ces résultats ainsi que les résultats obtenus sur une souche chloroquinorésistante. Les tests d'activité cytotoxique des extraits est déterminée sur des cellules Kb isolées d'un carcinome du nasopharynx humain.

Tableau 18. *Résultats des tests biologiques des extraits de Q. paraensis*

Extrait	% Inhib.	$CI_{50} \dagger Pf^*$	$CI_{50} \dagger Pf^{**}$	$CE_{50} \dagger \ddagger$ Cellules KB
CH_2Cl_2	88			
Éther de pétrole		$4,2 \pm 0,8$	$12,3 \pm 0,43$	$6,1 \pm 1,27$
MeOH		$1,7 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,99$	$3,8 \pm 0,14$
Chloroquine		$0,02 \pm 0,008$	$0,074 \pm 0,02$	$3,4 \pm 0,5$

$\dagger$ =en $\mu\text{g/ml}$; *souche chloroquinosensible; **souche chloroquinorésistante; CI_{50} = concentration d'inhibition du 50% de la parasitémie;
 $\ddagger$ =concentration effective

II.5. Dunalia brachyacantha, Miers (Solanaceae).



Figure 8. *Dunalia brachyacantha*⁵⁴ Miers

II.5.1. Présentation botanique et ethnopharmacologique

*Dunalia brachyacantha*⁵⁴ Miers (Solanaceae) est une espèce arbustive épineuse typiquement andine, pouvant atteindre 4 m. Les épines ligneuses peuvent atteindre 5 cm. Les feuilles sont entières. L'inflorescence est axillaire composée de fleurs tubulaires violettes. Le fruit est une baie orangée à maturité. Les fleurs sont présentes durant toute l'année, surtout d'août à janvier. Cette espèce se rencontre dans les zones sèches des vallées interandines montagneuses, de 2000m à 3500m. Sa distribution en Bolivie s'étend dans les départements de Cochabamba, La Paz et Tarija.

Les feuilles fraîches écrasées s'appliquent sous forme de cataplasme sur les hématomes, les coups, et les gonflements.⁶⁰ *D. brachyacantha* est une espèce dont l'usage chez les raqaypampeños est préconisé pour soulager les douleurs stomacales, cette action pourrait être imputée à une activité antibactérienne.

II.5.2. Extraction

Les essais préliminaires pharmacologiques sur les feuilles de *D. brachyacantha*, ont montré une forte activité contre les parasites responsables de la maladie de Chagas et de certaines leishmanioses. Une bonne activité antipaludique de l'extrait hydroéthanolique des tiges est démontrée avec 70% d'inhibition de la parasitémie de *P. berghei* à 807 mg/kg/jour (*in vivo*) et 96% d'inhibition de *P. falciparum* à 100 µg/ml (*in vitro*).

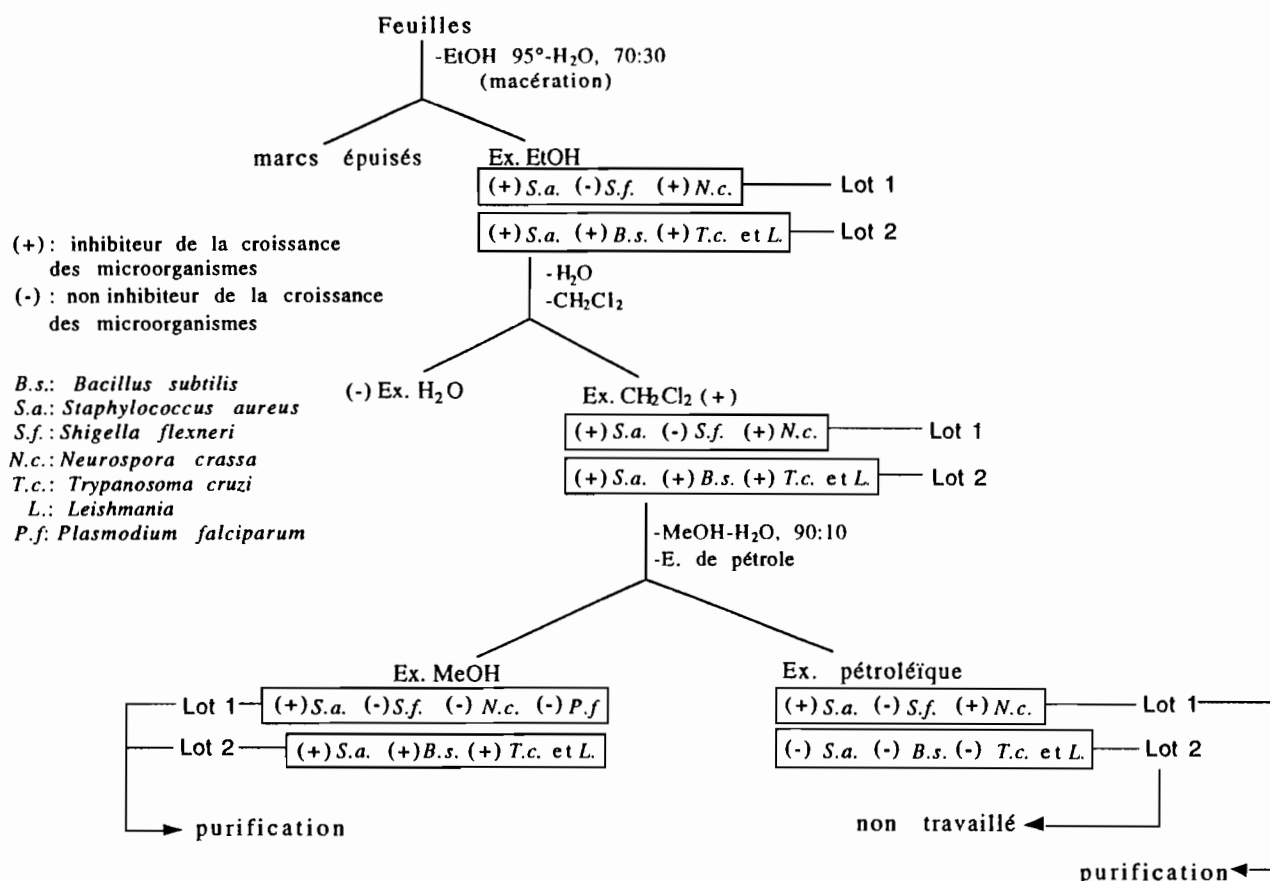
Parallèlement, des essais antifongiques et antibactériens réalisés à l'Institut de Recherches Pharmacobiochimiques de l'Université San Andrés de La Paz, montrent une activité anti-infectieuse pour les extraits foliaires. Dû fait de l'inexistence de médicaments actifs sur la phase chronique de la maladie de Chagas, la recherche des métabolites des feuilles de *D. brachyacantha* et responsables d'une telle activité a été poursuivie.

Deux lots de *D. brachyacantha* ont été récoltés et extraits; l'un provient de la région de Cochabamba, dans la vallée de Mizque, et le second a été récolté à La Paz dans la vallée de Cota-Cota.

L'extraction des feuilles de ces deux lots a été effectuée selon le même protocole (Schéma 5).

Un extrait primaire est réalisé par macération des feuilles broyées dans le mélange hydroalcoolique EtOH 95°- H₂O (70:30). Après élimination de l'éthanol, le résidu en phase aqueuse est partagé entre l'H₂O et le CH₂Cl₂. La phase organique est évaporée, et le résidu est dissous dans un mélange CH₃OH-H₂O (90:10) puis extrait par l'éther de pétrole. Les deux fractions sont récupérées et concentrées.

Le poids des extraits obtenus à partir des deux lots et les rendements d'extraction sont consignés dans le Tableau 19.



que les composés peu polaires et actifs extraits par l'éther de pétrole peuvent être présents à des concentrations différentes dans les 2 lots.

L'activité antifongique a été mesurée sur les extraits du premier lot (Cochabamba). Ici aussi les extraits sont actifs sur *Neurospora crassa* (à 1,25 µg/ml) excepté pour l'extrait MeOH. L'activité de la fraction méthanolique du lot de Cochabamba contre *P. falciparum* chloroquinosensible n'est pas très importante avec 96, 22 et 0% d'inhibition aux doses de 100, 10 et 1 µg/ml, ce qui donne une CI₅₀ de 32 µg/ml.

L'obtention d'une plus grande quantité d'extraits à partir du deuxième lot (La Paz) a permis de réaliser des essais biologiques *in vitro* sur différentes souches de *Leishmania* et sur *Trypanosoma cruzi*. Les résultats de ces essais sont résumés dans le Tableau 20.

Tableau 20. *Activité antiprotozoaire et antibactérienne des extraits provenant du lot 2 des feuilles de D. brachyacantha*

Extrait	Conc.†	Espèces*					
		Tc§	Lb§	La§	Ld§	Bs‡	Sa‡
EtOH	10	+++	+++	+++	+++	(+)	(+)
CH ₂ Cl ₂	10	+++	+++	+++	+++	(+)	(+)
MeOH	10	+++	+++	+++	+++	(+)	(+)
Pentamidine	10	++	+++	+++	+++		

*La = *Leishmania amazonensis*; Lb = *Leishmania braziliensis*; Ld = *Leishmania donovani*; Tc = *Trypanosoma cruzi*; Bs = *Bacillus subtilis*, Sa = *Staphylococcus aureus*; †: en µg/ml; §: += 50% d'épimastigotes ou promastigotes, avec peu formes dégénératives; +++=lyse totale des parasites; ‡: (+)=inhibition de la croissance de bactéries sur boîte de Pétri à la dose de 0,25 mg/ml

Les très bons indices d'activité de l'extrait MeOH le sélectionnent pour une purification bioguidée.

Les racines de *D. brachyacantha* récoltées à La Paz ont été extraites. L'extrait hydroéthanolique a été obtenu par macération dans le mélange EtOH 95°-H₂O 70:30. Après filtration, la solution est concentrée puis lyophilisée. Les racines ne possèdent pas d'activité biologique comme le montre le Tableau 21.

Tableau 21. *Essais antiparasitaires et antibactériens de l'extrait hydroéthanolique des racines de D. brachyacantha*

Extrait	Conc.†	Espèces*					
		Tc§	Lb§	La§	Ld§	Bs‡	Sa‡
EtOH	100 (dans MeOH)	0	0	0	0	(-)	(-)
EtOH	100 (dans EtOH 70)	0	0	0	0	(-)	(-)
EtOH	100 (dans H ₂ O)	0	0	0	0	(-)	(-)
Pentamidine	10	0	+++	+++	+		

*La = *Leishmania amazonensis*; Lb = *Leishmania braziliensis*; Ld = *Leishmania donovani*; Tc = *Trypanosoma cruzi*; †: en µg/ml; §0= Nombre d'épimastigotes ou promastigotes identique au contrôle; += 75% d'épimastigotes ou promastigotes, avec peu de formes dégénératives; +++= lyse totale des parasites; ‡: (-)=pas d'inhibition de la croissance de bactéries sur boîte de Pétri à la dose de 0,25 mg/ml

II.6. Notholaena nivea var. *flava*, Hook (Pteridaceae).

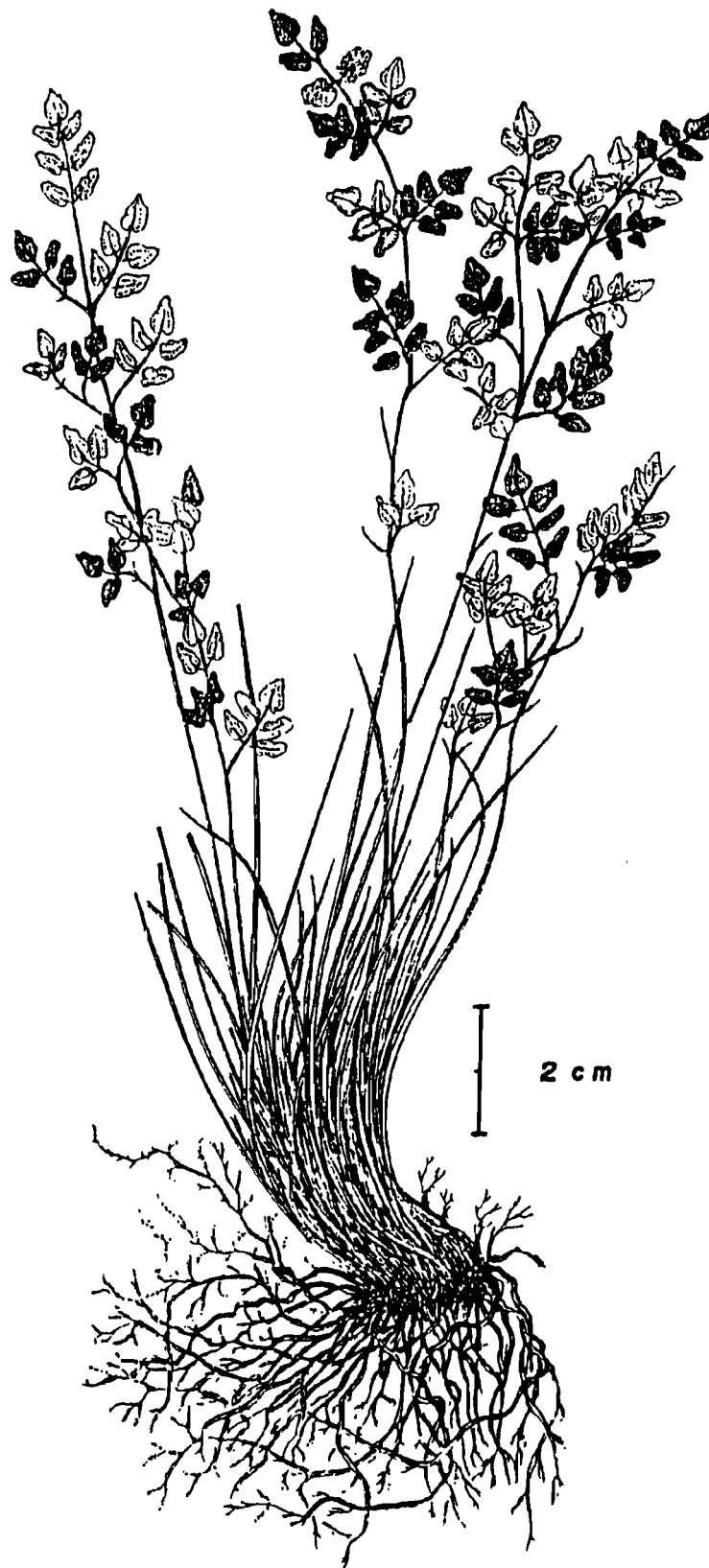


Figure 9. *Notholaena nivea* var. *flava* ⁶¹Hook

II.6.1. Présentation botanique et ethnopharmacologique

Notholanea nivea (Poir.) Desv. var. *flava*⁶¹ Hook (Pteridaceae) possède un rhizome couvert de poils bruns orangés, d'où partent de nombreux rameaux grêles bruns foncés, au bout desquels se trouvent de petites frondes (10 cm) bien découpées. La fougère entière ne dépasse pas les 30 cm. Cette espèce doit son nom latin "flava" et son nom vernaculaire 'doradillo' à la coloration très particulière de l'envers de ses frondes, d'un beau jaune d'or vif. Cette fougère a un habitat terrestre, et se rencontre fréquemment dans les endroits bien exposés au soleil. Elle affectionne les habitats rocheux, et se trouve dans les vallées interandines boliviennes, entre 1700 et 2600 m.

N. nivea var. *flava* est utilisée dans la pharmacopée des Raqaypampeños pour soulager la "douleur de poumons", pouvant être mis en relation avec des affections broncho-pulmonaires (infections souvent d'origine bactérienne), à l'asthme, aux problèmes cardiaques. La drogue est administrée en infusion de la plante entière. D'après la pharmacopée Kallawaya,⁶² les feuilles de cette espèce sont réputées pour leurs qualités digestives, et servent à la préparation de sauces piquantes, "llajwa". Les feuilles et tiges fraîches avec trois feuilles de *saucó* (*Zanthoxylum* sp., Rutaceae) en décoction sont utilisées dans le traitement de l'hydropisie pour leur propriété sudorifique. La décoction des rhizomes est utilisée comme vermifuge, cependant, elle présente une certaine toxicité pour les moutons, qui tremblent violemment après l'avoir ingérée.⁶³

II.6.2. Extraction

L'extrait brut obtenu au CH_2Cl_2 à partir des feuilles non séchées de *N. nivea* var. *flava* possède une activité inhibitrice de la croissance des souches de *Neurospora crassa* à une concentration de 0,06 mg/ml. Néanmoins cet extrait a manifesté une toxicité sur les microcrevettes *Artemia salina* à la concentration de 14 ppm. L'extrait des tiges de *N. nivea* var. *flava*, ne possède pas d'activité antifongique.

L'extrait hydroalcoolique à 30% d'eau obtenu après macération des feuilles de *N. nivea* var. *flava* dans le mélange EtOH- H_2O (70:30) est concentré par évaporation de l'alcool puis partagé contre le CH_2Cl_2 (Schéma 6). Les deux fractions (H_2O et CH_2Cl_2) évaluées pour leur activité antifongique et cytotoxique (*Artemia salina*), manifestent une cytotoxicité élevée ($\text{DL}_{50} < 100$ ppm). L'activité contre *Neurospora crassa* n'est apparue qu'avec l'extrait CH_2Cl_2 . Cette activité est maintenue constante jusqu'à 0,06 mg/ml (Tableau 22).

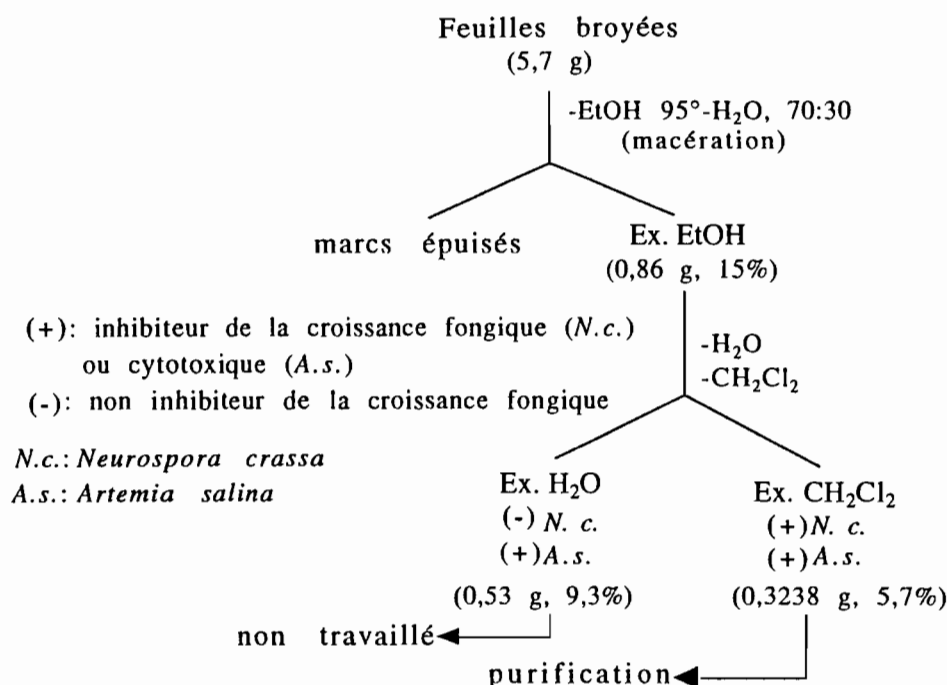


Schéma 6. Extraction des feuilles de *N. nivea* var. *flava*

Tableau 22. Activité de l'extrait dichlorométhane des feuilles de *N. nivea* var. *flava* contre *Neurospora crassa*

Extrait	Conc. (mg/ml)	<i>N. crassa</i> *
CH ₂ Cl ₂	0,125	+
	0,06	+
	0,03	-
H ₂ O	0,125	-
	0,06	-
	0,03	-

*+=inhibiteur de la croissance fongique; -=non inhibiteur de la croissance fongique

L'extrait organique est inhibiteur de la croissance de la levure *Candida albicans* et des dermatophytes *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporum canis* (Tableau 23).

L'observation journalière de la variation des diamètres d'inhibition pendant huit jours, montre que l'activité est constante jusqu'au huitième jour à 0,25 mg/ml et jusqu'au sixième à 0,125 mg/ml, pour *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporum canis*. L'activité à 0,25 mg/ml contre *Candida albicans* demeure jusqu'au deuxième jour, en disparaissant le troisième jour.

Tableau 23. *Essais d'activité contre des dermatophytes et la levure pour l'extrait CH₂Cl₂ des feuilles de N. nivea var. flava*

Espèce	Temps (jours)	Concentrations(mg/ml), (+: inhibition, -:pas d'inhibition fongique)			kétoconazole	solvant
		0,5	0,25	0,125		
<i>Candida albicans.</i>	1	+	+	-	+	-
	2	+	+	-	+	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	2	+	+	+	-	-
	3	+	+	+	-	-
	4	+	+	+	+	-
	5	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	-
	7	+	+	-	+	-
	8	+	+	-	+	-
<i>T. mentagrophytes</i>	2	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	-
	4	+	+	+	+	-
	5	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	-
	7	+	+	-	+	-
	8	+	+	-	+	-
<i>Microsporum canis</i>	2	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	-
	4	+	+	+	+	-
	5	+	+	+	+	-
	6	+	+	+	+	-
	7	+	+	-	+	-
	8	+	+	-	+	-

Ces résultats nous encouragent pour la purification de l'extrait dichlorométhanique afin de rechercher les principes actifs antifongiques.

II.7. *Cavanillesia* aff. *hylogeiton*, Ulbr. (Bombacaceae).

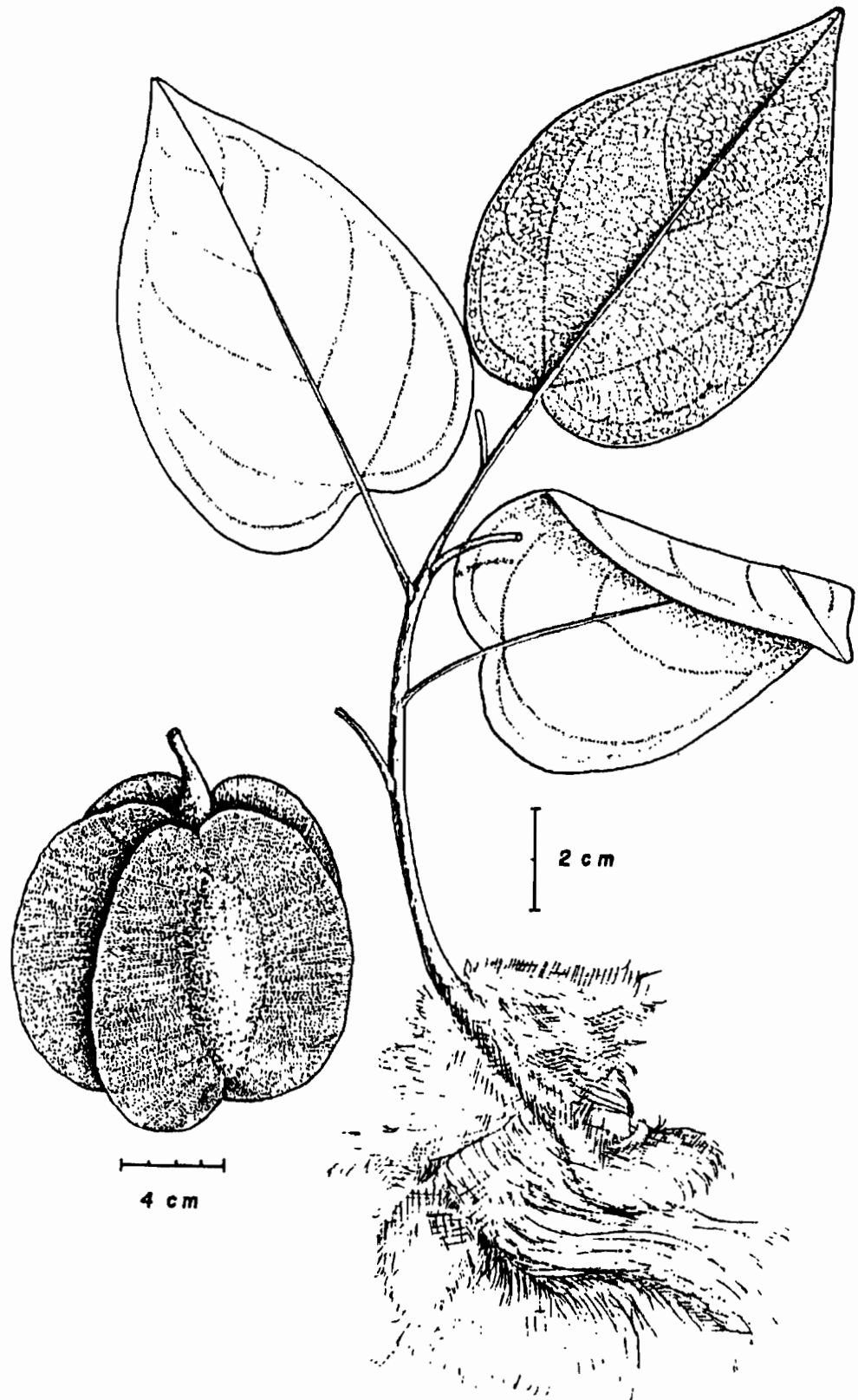


Figure 10. *Cavanillesia* aff. *hylogeiton* ⁵⁴ Ulbr.

II.6.4. Présentation botanique et ethnopharmacologique

Le genre *Cavanillesia*⁵⁴ est tropical, et comprend 3 espèces. *Cavanillesia* aff. *hylogeiton*⁵⁴ est un arbre pouvant atteindre 25 m en forêt humide amazonienne de plaine et d'altitude (250-850m). Les fleurs apparaissent en novembre. L'écorce externe fortement exfoliante ressemble à du papier. Les feuilles sont simples, légèrement lobées. Les fleurs sont disposées en cime umbelliforme, axillaire. Le calice est campanulé, les pétales charnus sont roses-rouges. Le fruit est une samare, avec cinq ailes membraneuses très élargies latéralement.

Les Tacanas attribuent des propriétés médicinales à cette espèce. L'écorce préparée en décoction est censée favoriser la prise de poids chez les personnes et les animaux. Cette même décoction, administrée durant la nouvelle lune aurait des propriétés contraceptives.¹¹

II.6.5. Extraction

L'extrait hydroéthanolique (30:70) montre une CI_{50} antiplasmodiale de 3 µg/ml. Une telle activité nous a incité à rechercher les principes actifs responsables.

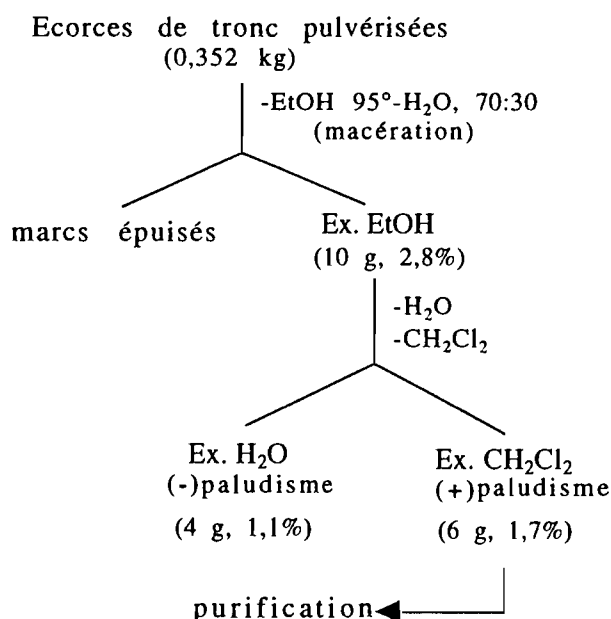


Schéma 7. Extraction des écorces de *C. aff. hylogeiton*

L'écorce de tronc séchée et pulvérisée est mise à macérer dans l'EtOH 95°/H₂O, 70:30 après filtration, la solution est évaporée. Le résidu est ensuite dissous dans l'eau et partagé contre le CH₂Cl₂; l'extrait

CH_2Cl_2 possède l'activité contre *P. falciparum in vitro*, et il sera donc étudié dans le chapitre suivant en vue de la caractérisation des principes actifs antipaludiques (Schéma 7, Tableau 24).

Tableau 24. *Résultats des tests antipaludiques sur les extraits de C. aff. hylogeiton*

Extrait	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	% inhibition¶	% inhibition†
EtOH	1	100	100
CH_2Cl_2	1	100	100

¶: souche chloroquinosensible de *Plasmodium falciparum* ; †: souche chloroquinorésistante de *P. falciparum*, méthode radioisotopique

III.TROISIÈME PARTIE

PURIFICATION BIOGUIDÉE DES COMPOSÉS ACTIFS DES ESPÈCES ÉTUDIÉES

III.1. Introduction

Cette partie présente la recherche bibliographique ayant trait à la composition chimique des six espèces étudiées ou de leurs genres. La purification bioguidée des différents extraits révélés actifs dans la partie II et l'isolement des produits purs seront discutés. Ces étapes se font principalement par chromatographie à l'aide de différentes méthodes, en particulier par affinité (gel de silice) et par exclusion (Sephadex LH-20); le critère pour le regroupement des fractions est basé sur leur profil chromatographique d'après l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM). Nous présentons ici les structures de tous les composés isolés, pour lesquels les analyses de détermination structurale seront exposées dans la quatrième partie de cette thèse. Nous discuterons d'une part les résultats de l'évaluation d'activité biologique antipaludique, antileishmanienne ou contre la maladie de Chagas, et d'autre part les résultats des tests antibactériens et antifongiques contre des bactéries à gram (+) et à gram(-) et contre des espèces fongiques.

III.2. *Senecio smithioides*

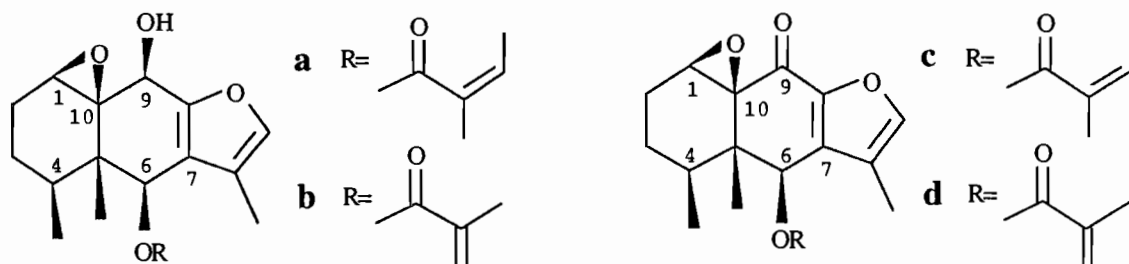
III.2.1. Etude bibliographique du genre *Senecio*

D'après la recherche bibliographique, l'espèce *Senecio smithioides* n'a pas fait l'objet d'études chimiques.

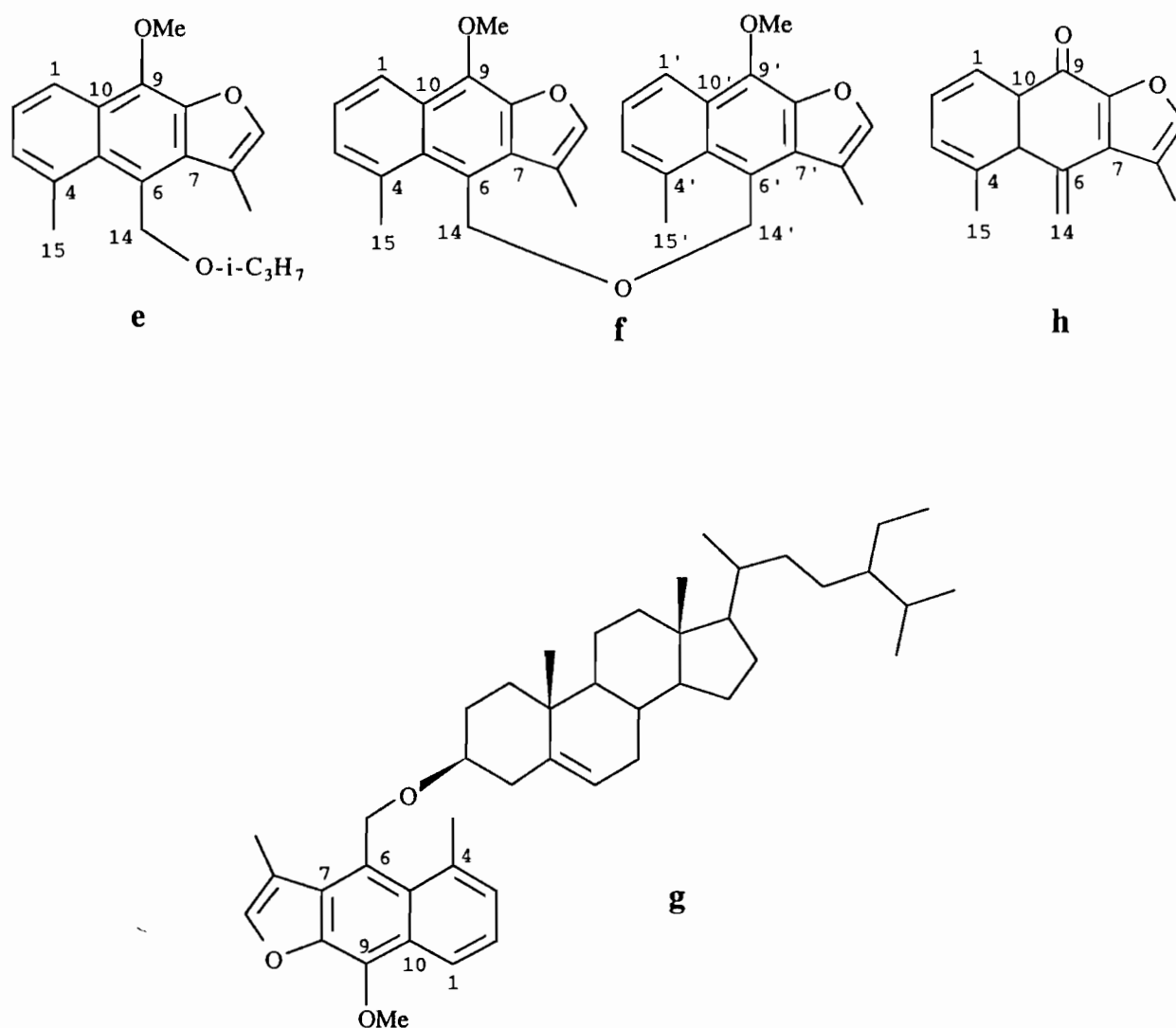
L'étude des composés rencontrés dans le genre *Senecio* a été énormément développée. La bibliographie décrit principalement la présence de dérivés terpéniques (1433 références relatives à des sesquiterpènes ont été rapportées) et d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (1129 références); la présence de flavonoïdes, quinones et de composés phénoliques est citée moins fréquemment.⁶⁴

Parmi la grande quantité de sesquiterpènes isolés, nous mentionnerons simplement quelques exemples de dérivés à squelette furanoérémophilane, du fait de la mise en évidence par nous mêmes de ce type de composé dans les feuilles de l'espèce étudiée, *S. smithioides*.

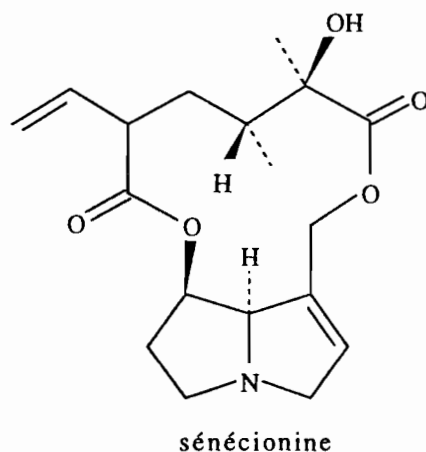
-1 β ,10 β -époxy-6 β -angeloyloxy-9 β -hydroxyfuranoérémophilane (a), 1 β ,10 β -époxy-6 β -(2-méthylacryloyloxy)-9 β -hydroxyfuranoérémophilane (b), 1 β ,10 β -époxy-6 β -angeloyloxy-furanoérémophil-9-one (c) et 1 β ,10 β -époxy-6 β -(2-méthylacryloyloxy)-furanoérémophil-9-one (d) des racines de *S. arnicoides* récoltées dans les hautes régions de l'Himalaya en Inde.⁶⁵



-14-isopropoxydéhydrocacalohastine (e), 14-(déhydrocacalohasti-14'-oxy)-déhydrocacalohastine (f), 14- β -sitosteryloxydéhydrocacalohastine (g), 6,14-déhydro-9-oxo-cacalohastine (h) des parties aériennes de *S. linifolius*.⁶⁶

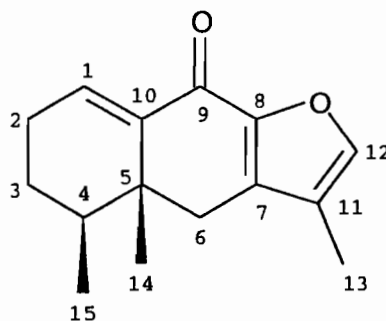


Un exemple du type structural des alcaloïdes pyrrolizidiniques du genre *Senecio* est la sénécionine de *Senecio vulgaris*.⁶⁷ L'espèce *Senecio smithioides* ne contient pas d'alcaloïdes, d'après le résultat négatif du test de Dragendorff pratiqué sur les différents extraits.



III.2.2. Purification bioguidée de l'extrait éthero-pétroléique

L'extrait à l'éther de pétrole défini comme actif (paragraphe II.2.2.), concentré sous pression réduite, donne un précipité quantitatif cristallin blanc. Les cristaux séparés par filtration et recristallisés dans l'éther de pétrole (20-40°) ont été testés contre *Plasmodium falciparum*. Le filtrat est pauvrement actif avec une $CI_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ (Schéma 8). Les cristaux furent identifiés d'après les analyses spectroscopiques à la furanoérémophil-1(10)-en-9-one (**1**).



1 furanoérémophil-1(10)-en-9-one

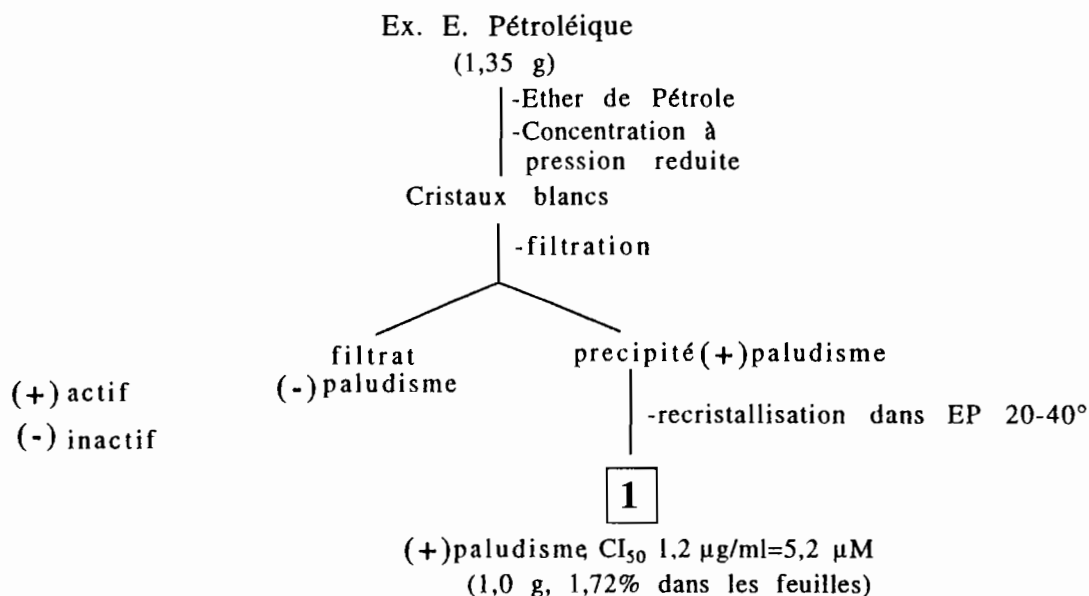


Schéma 8. Purification de l'extrait éthéro-pétroléique des feuilles de *S. smithioides*

Le composé 1, manifeste une bonne activité contre *P. falciparum* avec une CI_{50} de 1,2 µg/ml (5,2 µM) et peut être considéré comme le principe actif antipaludique *in vitro* de l'espèce *S. smithioides*. L'activité antileishmanienne et antichagasique diminue pour 1 au fur et à mesure que la dose du principe actif diminue, elle est donc dose dépendante (Tableau 25). L'activité antibactérienne et antifongique est presque inexistante.

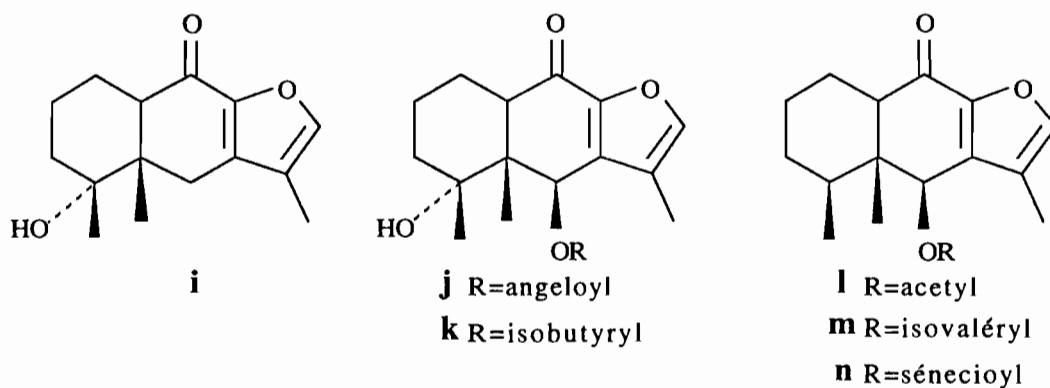
Tableau 25. Résultats des tests antiprotozoaires avec le composé 1 isolé de *S. smithioides*

Composé	Conc. ‡	Espèces*				
		<i>T.c.</i> §	<i>L.b.</i> §	<i>L.a.</i> §	<i>L.d.</i> §	<i>P.f.</i>
1	100	+	+++	+++	+++	
	50	0	++	++	++	
	25	0	0	0	0	
	CI_{50}					1,2‡ (5,2 µM)

*Tc = *Trypanosoma cruzi*, La = *Leishmania amazonensis*; Lb = *Leishmania braziliensis*; Ld = *Leishmania donovani*; Pf = *Plasmodium falciparum*; ‡ en µg/ml; §0= Nombre d'épimastigotes ou de promastigotes identique au contrôle, += 75% d'épimastigotes ou de promastigotes avec peu de formes dégénératives, ++= 50% d'épimastigotes ou de promastigotes avec peu de formes dégénératives, +++= pas d'épimastigotes ou promastigotes, lyse totale des parasites

Seules trois espèces ont été rapportées pour une utilisation spécifique contre la malaria ou des symptômes correspondant à une attaque de paludisme (fièvre): *S. brasiliensis*⁶⁴ et *S. discolor*,^{64,68} en décoction aqueuse buvable de la plante entière, et *S. mannii*^{64,69} en décoction des feuilles. Parmi ces espèces, les deux premières contiennent des dérivés voisins du composé 1. Parmi les 9 références⁶⁴ sur la composition chimique de *S. brasiliensis*, aucune ne rapporte une évaluation antipaludique des composés purs isolés. Parmi ceux-ci, 8 sont des alcaloïdes pyrrolizidiniques et 9 des sesquiterpènes

qui sont des dérivés des squelettes germacrène D,⁷⁰ cacalol⁷¹ et caryophyllène.⁷² *S. discolor* est une espèce riche en furanoérémophil-9-ones.⁷³ 4 α -hydroxy-furanoérémophil-9-one (**i**), 6 β -angeloyloxy-4 α -hydroxy-furanoérémophil-9-one (**j**), 6 β -iso-butyryloxy-4 α -hydroxy-furanoérémophil-9-one (**k**), 6 β -acétoxy-furanoérémophil-9-one (**l**), 6 β -iso-valéryloxy-furanoérémophil-9-one (**m**), 6 β -séneciolyloxy-furanoérémophil-9-one (**n**). Il serait donc intéressant d'étudier l'activité antipaludique *in vitro* de ces composés pour dégager une éventuelle relation structure activité.



Pour la dernière espèce *S. mannii*, il n'existe pas à notre connaissance de travaux qui décrivent sa composition chimique.

III.3. *Amburana cearensis* (Fabaceae)

Le travail d'isolement bioguidé à partir des écorces de *A. cearensis* a permis d'isoler trois produits, dont deux se sont révélés être actifs contre *Plasmodium falciparum* et deux de structures originales.⁷⁴ Les espèces appartenant au genre *Amburana* n'ont pas fait l'objet d'études approfondies. Un seul article rapporte la présence de la coumarine dans les graines de *Amburana cearensis* et *A. acreana*.⁷⁵ Seuls les extraits actifs au CH_2Cl_2 et à l'AcOEt ont été travaillés, l'extrait le moins intéressant du point de vue biologique (EtOH 95°) n'a pas été analysé.

III.3.1. Purification bioguidée des extraits

III.3.1.1. Extrait éthéro-pétroléique

L'extrait éthéro-pétroléique a montré 70 et 47% d'inhibition de *P. falciparum* à 100 et 10 $\mu\text{g/ml}$. Cet extrait a donné lieu à la formation d'un précipité cristallin blanc lors de sa concentration sous pression réduite (Schéma 9). Les cristaux blancs ont été analysés comme étant la coumarine (composé 2). Cette coumarine possède une CI_{50} de 9,0 $\mu\text{g/ml}$ (61,6 μM , Tableau 26) contre *P. falciparum*.

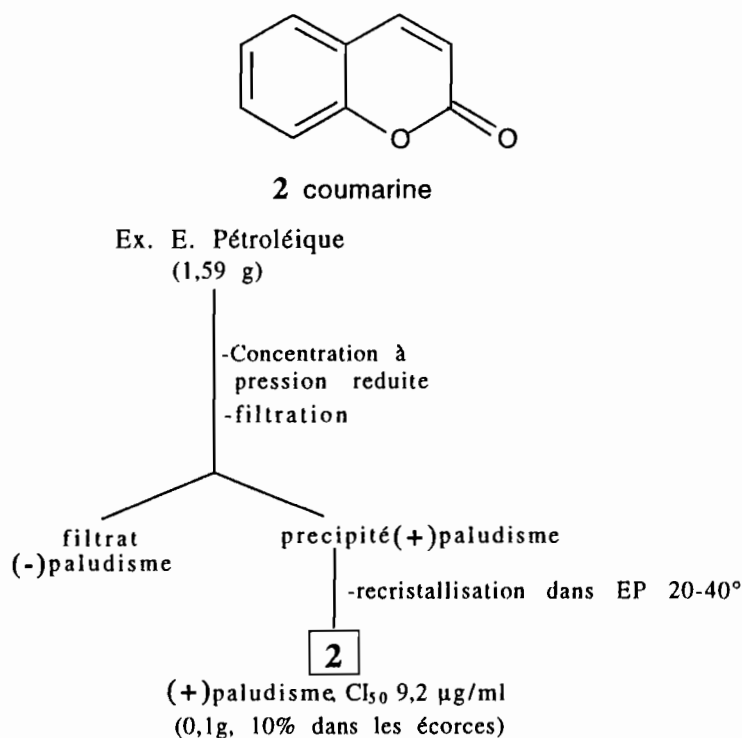


Schéma 9. Purification de l'extrait éthéro-pétroléique des écorces de *A. cearensis*

III.3.1.2.Extrait au dichlorométhane

L'extrait obtenu au CH_2Cl_2 est le plus actif de tous les extraits (96 et 62% à 100 et 50 $\mu\text{g/ml}$ d'inhibition de croissance de *P. falciparum*). Pour isoler le(s) composé(s) responsable(s) de cette activité, une purification sur colonne de chromatographie en phase liquide à moyenne pression⁷⁶ (CCMP) sur silice 60 H et éluée avec un gradient $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ a été réalisée (Schéma 10).

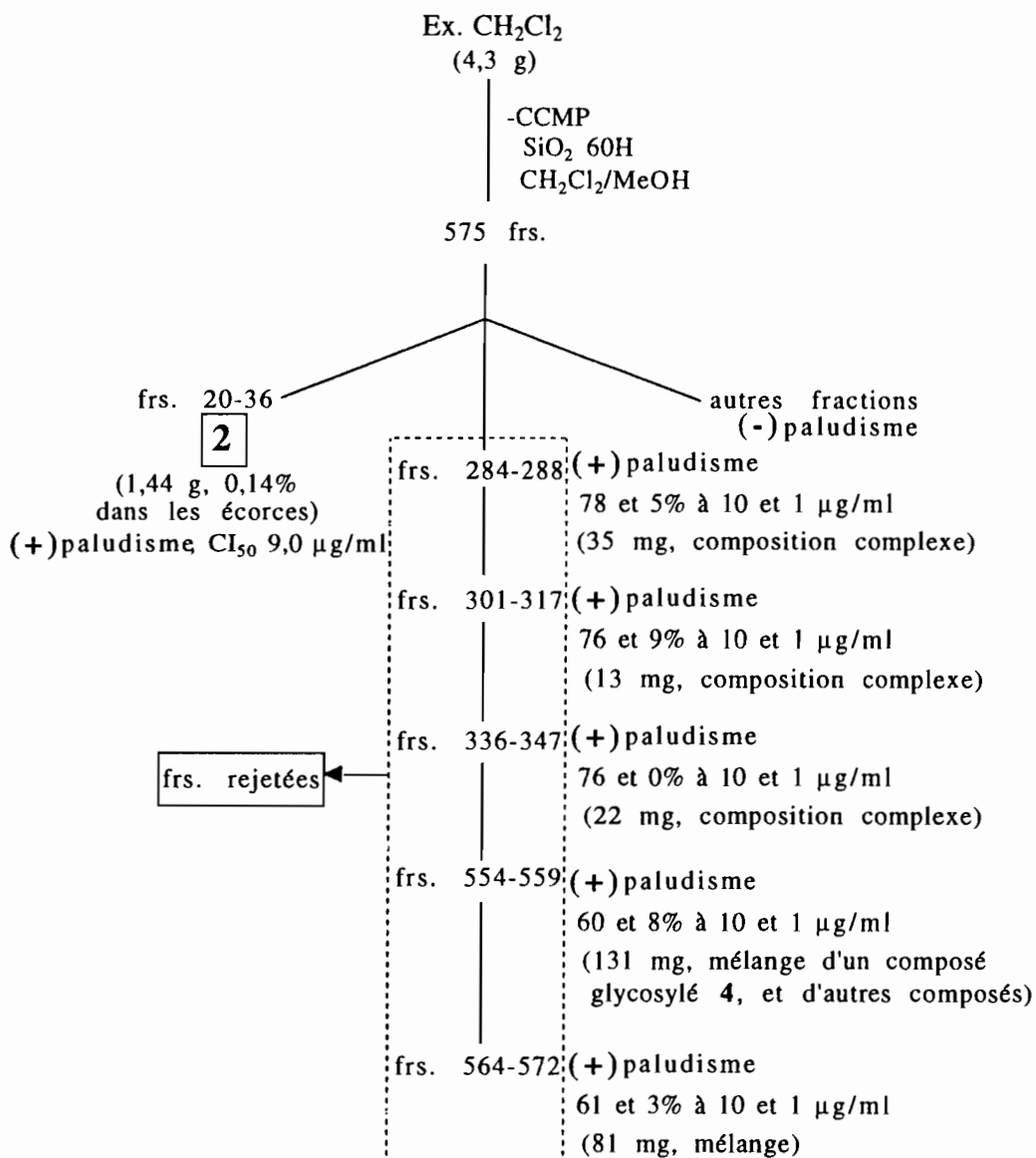


Schéma 10. Purification de l'extrait au dichlorométhane des écorces de *A. cearensis*

Cette séparation a conduit à l'isolement du produit majoritaire actif de l'extrait, la coumarine (2). Les indices d'activité antipaludique sont les mêmes que ceux mesurés avec la coumarine isolée de l'extrait

éthéro-pétroléique. De plus, des produits minoritaires inactifs comme des monoterpènes et des flavonoïdes ont été isolés pour lesquels les données de chimie structurale manquent en raison des quantités trop faibles obtenues.

Les fractions 554-559 sont constituées d'après le spectre de RMN ^1H , d'un produit majoritaire glycosylé **4**. Ce composé est l'un des composés majoritaires de l'extrait obtenu avec l'AcOEt. Sa structure et son activité sont discutées dans le paragraphe suivant.

Des produits minoritaires présentant de meilleurs indices antipaludiques ont été purifiés mais en raison des faibles quantités isolées, ou de la complexité des fractions les renfermant, ces produits n'ont pas été caractérisés.

III.3.1.3.Extrait à l'acétate d'éthyle

L'extrait préparé à l'aide de l'AcOEt, présente une activité de moindre importance (87 et 27% à 100 et 10 $\mu\text{g/ml}$). Sa purification a été conduite par une chromatographie liquide sur silice 60 H sous vide⁷⁷ (VLC) éluée avec le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (Schéma 11).

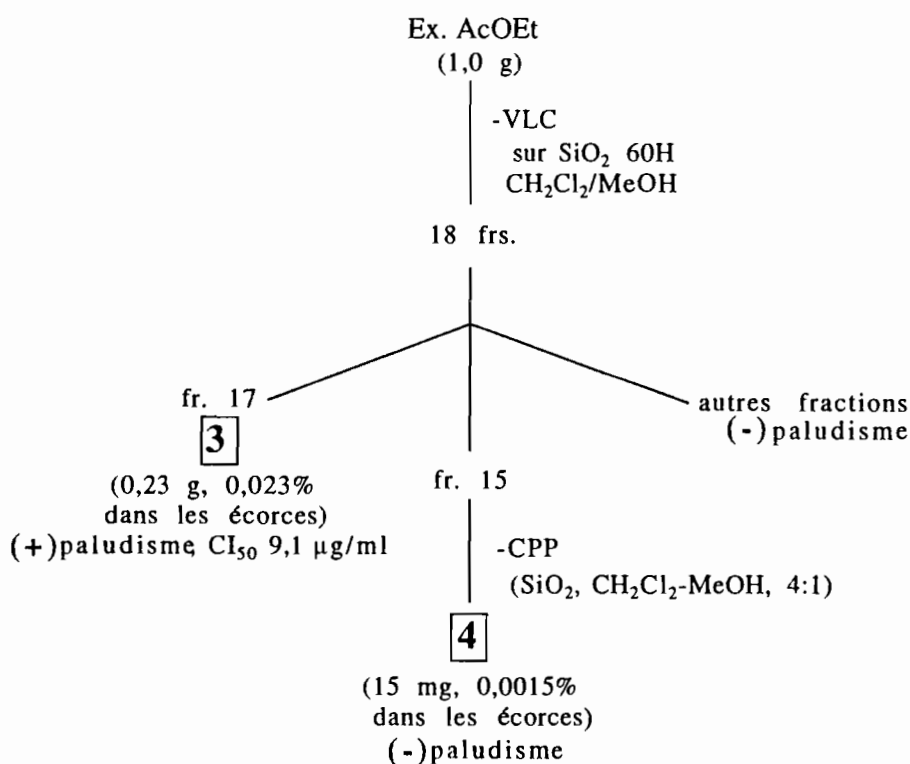
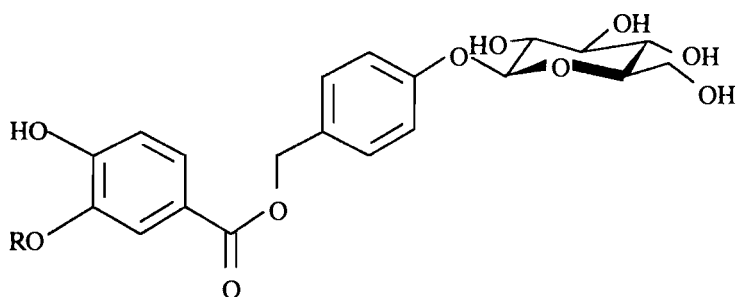


Schéma 11. Purification de l'extrait à l'acétate d'éthyle des écorces de *A. cearensis*

Dix-huit fractions ont été récoltées, les fractions les plus polaires se révélant posséder la meilleure activité. La fraction 15 donne après une purification par chromatographie sur plaque préparative de silice (CPP) le composé **4** dénommé amburoside B. Les fractions 16 et 17 renferment le composé **3** ou amburoside A, ce dernier étant présent à l'état pur dans la fraction 17. Ces deux composés se sont révélés être des hétérosides d'alcool benzylique estérifiés par des dérivés d'acide benzoïque.



3 amburoside A (R=H)

4 amburoside B (R=CH₃)

Le composé **3** montre une activité comparable à celle de la coumarine (**2**) avec une CI₅₀ de 9,1 µg/ml (21,6 µM). L'amélioration des indices d'inhibition de l'extrait par rapport au composé pur, indique que le composé **3**, est en effet l'un des principaux sinon le responsable de l'activité de l'extrait à l'AcOEt. Par contre le composé **4**, dérivé méthylé de **3**, est inactif sur *P. falciparum*.

Les résultats d'activité pour les composés isolés **2**, **3** et **4**, réalisés au laboratoire sur *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* ainsi que sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Trychophyton mentagrophytus*, *Microsporum canis*, *Candida albicans*, et *Epidermophyton floccosum* sont répertoriés dans le Tableau 26.

Les composés actifs contre le *P. falciparum*, la coumarine **2**, le dérivé phénolique **3** et le composé **4** de *A. cearensis*, ont donné une activité modérée voire nulle contre les différents stades d'évolution des autres parasites. Des essais de cytotoxicité sur des cellules KB montrent une CL₅₀ au delà de 100 µg/ml pour la coumarine (**2**); ce résultat de non toxicité en conjonction avec son caractère bactériostatique (Tableau 26), peuvent contribuer à justifier une éventuelle utilisation de la coumarine comme agent antibactérien chez l'humain. Les CI₅₀ sur *P. falciparum* des composés **2** et **3** permettent de les classer comme des agents antipaludiques modérés *in vitro*.

Tableau 26. Résultats des tests antiprotozoaires, antibactériens et antifongiques des composés isolés d'*A. cearensis*

Composé	Souches ou espèces*								
	Conc. †	Bs	Sa	Ec	Sf	Tm	Mc	Ca	Ef
2	1,0	-	-	+	+				
	0,5	-	-	+	+	+	-	+/-	+/-
	0,25	-	-	+	+	-	-	-	-
	0,125	-	-	+	+	-	-	-	-
	0,0625	-	-	-	-	-	+	-	-
	0,0312	-	-	-	-	-	-	-	-
3, 4	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,125	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,0625	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,0312	-	-	-	-	-	-	-	-
	Conc. ‡	Tc §	Lb §	La §	Ld §	Pf	Pf ¥	Pb CI ₅₀	Pb x
2	100	0	+	+	+		92		
	50	0	+	+	+				25
	10						62		
	1	0	0	0	0				
	CI ₅₀					9,0			
3	100	0	0	0	0				
	50	0	0	0	0				24
	10						55		
	1	0	0	0	0		45		
	CI ₅₀					9,1			
4	100	0	0	0	0				
	50	0	0	0	0				
	10						27		
	1	0	0	0	0		24		

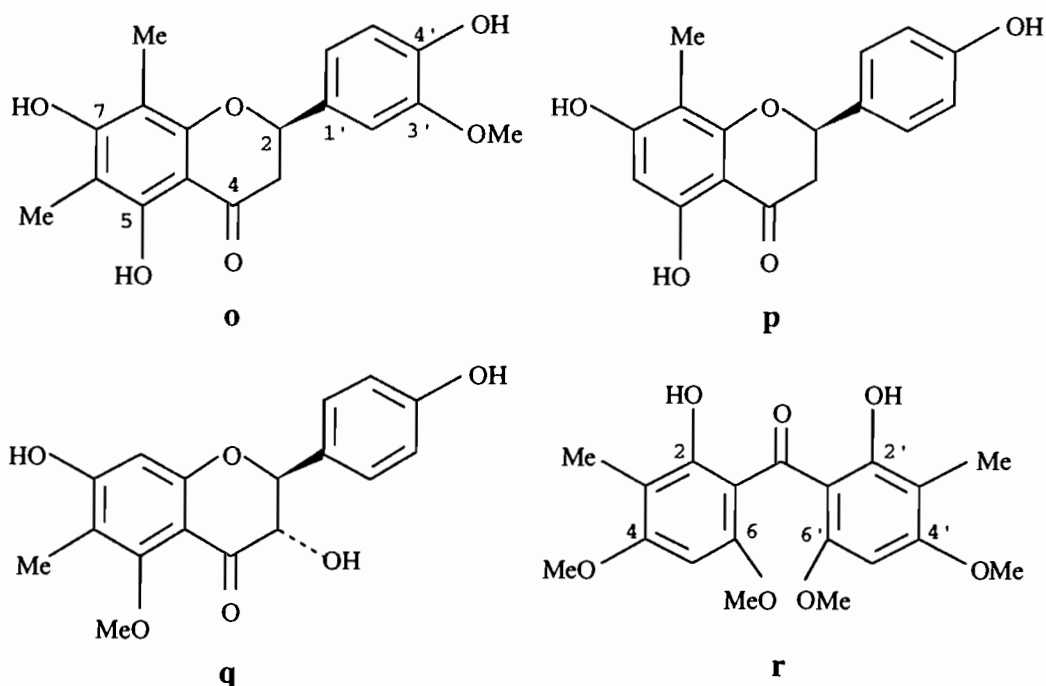
*Bs = *Bacillus subtilis*, Sa = *Staphylococcus aureus*, Ec = *Escherichia coli*, Sf = *Shigella flexneri*, La = *Leishmania amazonensis*; Lb = *Leishmania braziliensis*; Ld = *Leishmania donovani*; Tc = *Trypanosoma cruzi*, Tm = *Trychophyton mentagrophytes*, Mc = *Microsporum canis*, Ca = *Candida albicans*, Ef = *Epidermophyton floccosum*; †: en mg/ml; ‡: en µg/ml; §0 = Nombre d'épimastigotes ou de promastigotes identique au contrôle, += 75% d'épimastigotes ou de promastigotes avec peu de formes dégénératives; ||: Non testé; ¥: % d'inhibition de la parasitemie; x: % d'inhibition de la parasitemie en mg/kg/jour

III.4. *Qualea paraensis*

L'isolement bioguidé de cette plante a permis d'identifier trois produits, deux connus et un nouveau. Deux sont moyennement actifs sur *Plasmodium falciparum* et le troisième inactif.

III.4.1. Etude bibliographique du genre *Qualea*

La (2*R*)-5,7,4'-trihydroxy-3'-méthoxy-6,8-diméthylflavanone (**o**) a été caractérisée dans les écorces de tronc de *Q. paraensis*.⁷⁸ Ce produit accompagné de la (2*R*)-5,7,4'-trihydroxy-8-méthylflavanone (**p**), de la (2*S*, 3*S*)-3,7,4'-trihydroxy-5-méthoxy-6-méthylflavanone (**q**) et de la 2,2'-dihydroxy-4,6,4'-tétraméthoxy-3,3'-diméthyl-benzophénone⁷⁸ (**r**), a été isolé dans *Q. labouriana*.⁷⁸ Les espèces *Q. parviflora* et *Q. grandiflora* n'ont pas été caractérisées.⁷⁹



III.4.2. Purification bioguidée des extraits

III.4.2.1. Extrait méthanolique

L'extrait MeOH est séparé en neuf fractions par une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 éluée par le MeOH (Schéma 12). Les fractions 1 et 8 présentent une bonne activité: CI_{50} 0,59 $\mu\text{g/ml}$ (100, 92 et 50% d'inhibition à 100, 10 et 1 $\mu\text{g/ml}$) et CI_{50} 0,46 $\mu\text{g/ml}$ (92, 48 et 1% d'inhibition à 100, 10 et 1 $\mu\text{g/ml}$) respectivement. La fraction 2 semble aussi intéressante bien que

moins active, avec une CI_{50} de 4,14 $\mu\text{g/ml}$ (98, 91 et 11% d'inhibition à 100, 10 et 1 $\mu\text{g/ml}$). Les six autres fractions présentent une activité modérée avec des CI_{50} de 15 à 20 $\mu\text{g/ml}$. Des essais sur des souches de *Plasmodium falciparum* sensibles ou résistantes à la chloroquine ont été réalisés sur les fractions 1 et 8 pour constater toujours une importante activité d'après les CI_{50} $1,19 \pm 0,49 \mu\text{g/ml}$ et $1,64 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$ pour la fraction 1 et CI_{50} $1,68 \pm 0,99 \mu\text{g/ml}$ et $3,01 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$ pour la fraction 8.

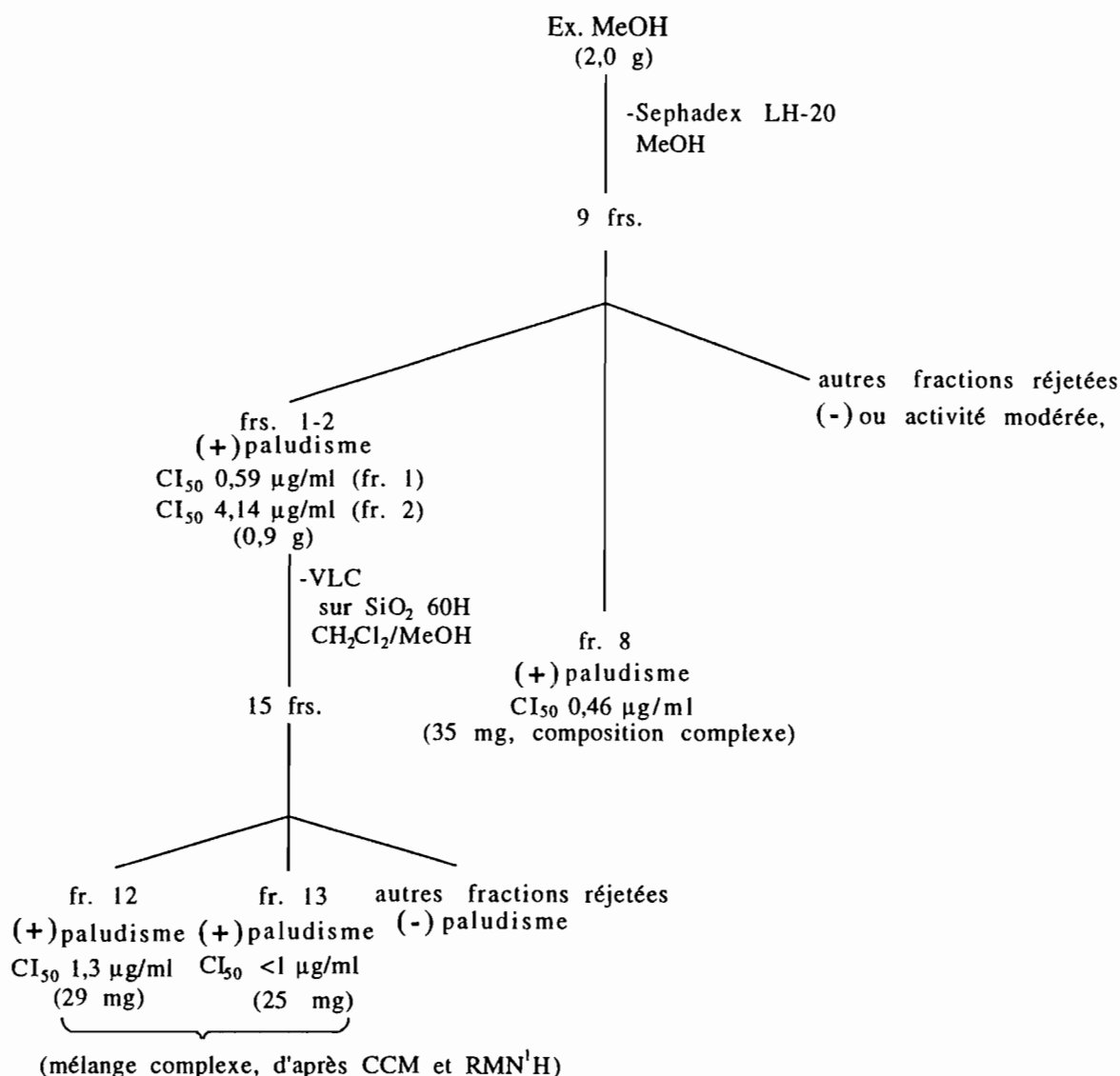


Schéma 12. Purification de l'extrait méthanolique des écorces de tronc de *Qualea paraensis*

Les fractions 1 et 2 ont été réunies d'après la similitude de leur composition (CCM) et de leur activité. Cet ensemble a été travaillé pour tenter une séparation au moyen d'une chromatographie liquide sous vide sur silice (VLC). Sur les 15 fractions recueillies, des essais antipaludiques *in vitro* ont montré que la fraction 13 était celle qui possédait l'activité antipaludique la meilleure ($CI_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$). Des

analyses en CCM et par RMN ^1H de la fraction 13, n'ont pas donné de résultats concernant la nature du (ou des) composé(s) responsable(s) d'une telle activité. Une seule tache "traînant" tout au long de la plaque CCM est observée quelque soit le système d'éluants utilisé, le spectre de RMN du proton est non analysable.

III.4.2.2.Extrait éthéro-pétroléique

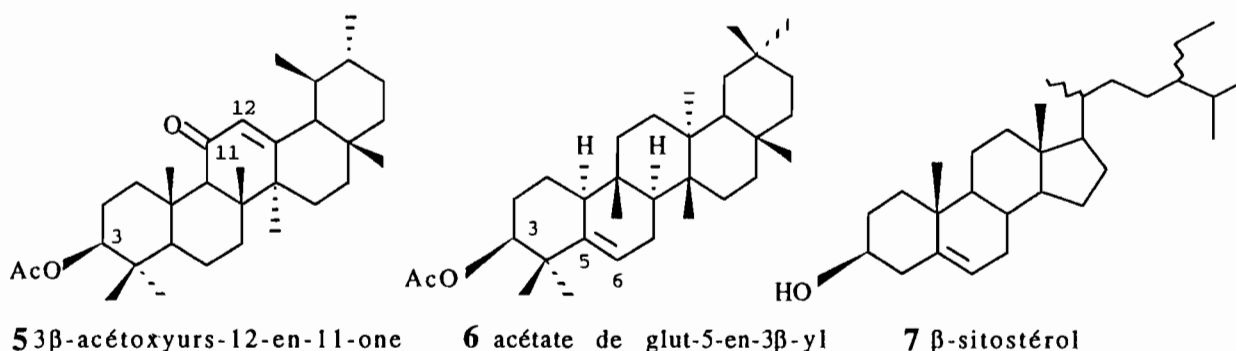
Le second extrait actif de *Q. paraensis* est l'extrait éthéro-pétroléique. Une première purification sur colonne avec une petite quantité d'extrait a été accomplie afin de mettre en évidence les fractions actives.

Une deuxième purification de l'extrait en plus grosse quantité a été obtenue par chromatographie en colonne ouverte (CC) de silice 60. Ont été recueillies: 32 fractions au moyen des mélanges éther de pétrole/ CH_2Cl_2 et $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Ces fractions ont été réunies dans 12 regroupements (Schéma 13).

Une CCM comparative des fractions obtenues dans les deux chromatographies a permis d'identifier que les fractions 2, 6, 7 et 8 contenaient les produits actifs. A partir des fractions 2 et 8, les composés **5**, **6** et **7** ont été isolés au moyen de chromatographies sur plaques préparatives (CPP) dans des éluants Hex- CH_2Cl_2 (17:3) pour la fraction 2 (composé **6**) et CH_2Cl_2 -MeOH (99:1) pour la fraction 8 (composés **5** et **7**).

Les trois composés purs ont été identifiés d'après leur analyses spectroscopiques comme la 3 β -acétoxyurs-12-en-11-one (**5**), l'acétate de glut-5-en-3 β -yl (**6**) et le β -sitostérol (**7**).

La fraction appelée 8.3 provenant de la fraction 8 possède une activité plus intéressante que les composés **5** et **7**, elle est malheureusement un mélange difficile à purifier.



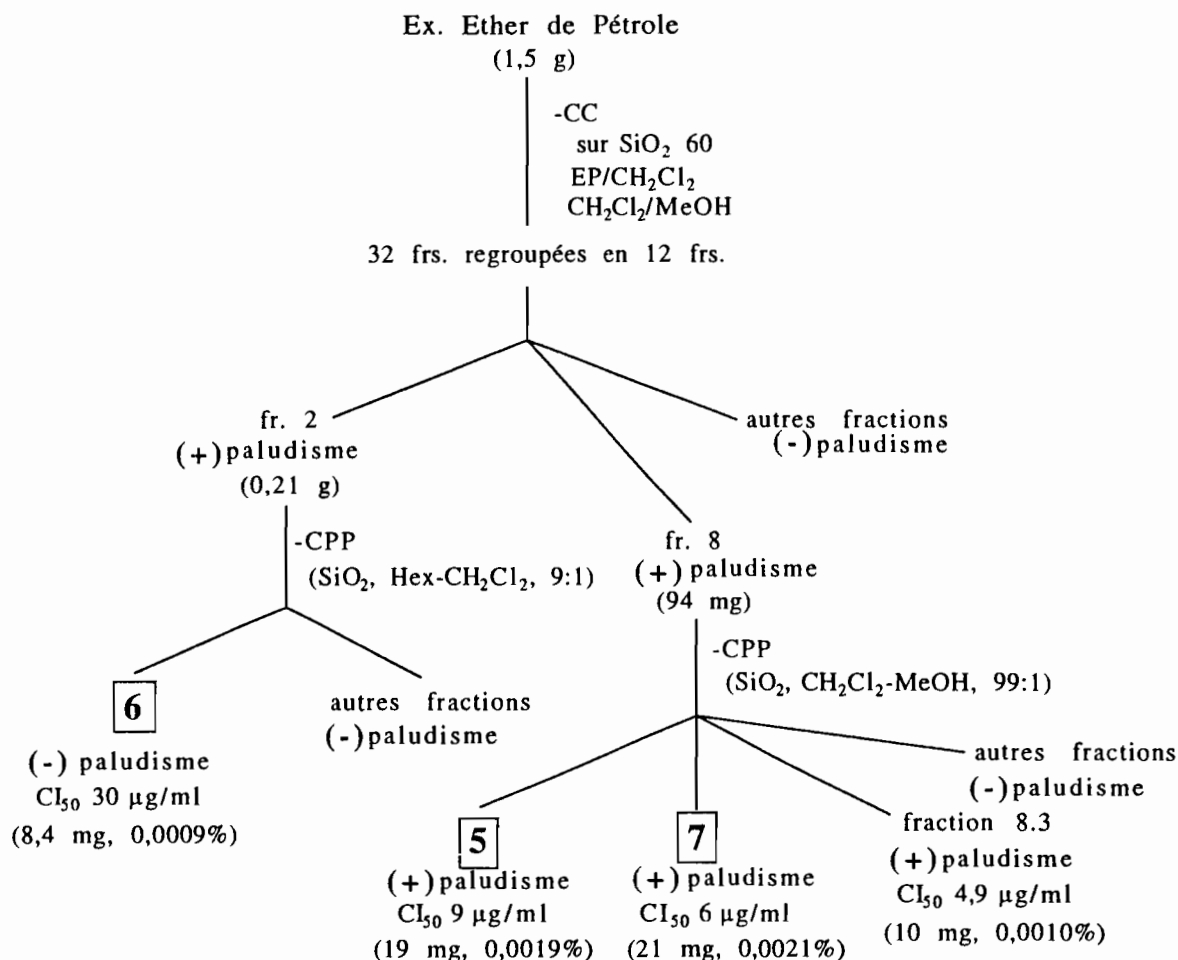


Schéma 13. Purification de l'extrait éthéro-pétroléique des écorces de tronc de *Q. paraensis*

Les produits purs ont été testés contre des souches de *P. falciparum* sensible et résistante à la chloroquine (Tableau 27). La fraction appelée 8.3 a aussi été testée.

Le Tableau 27 présente le rapport cytotoxicité/activité antipaludique appelé indice de sélectivité (IS) pour les extraits et les produits purs de *Q. paraensis*. L'indice de sélectivité d'une drogue (IS) correspond au rapport de la concentration effective 50 sur cellules tumorales (qui remplace la dose létale 50 dû au caractère *in vitro* de l'étude) sur la concentration inhibitrice 50 (CE_{50}/CI_{50}) sur *Plasmodium*.

Tableau 27. *Rapport cytotoxicité/activité antipaludique des composés de Q. paraensis*

Composé	<i>P.falciparum</i> sensible* (A)	<i>P.falciparum</i> résistante*(B)	Cellules KB§ (C)	IS¥ C/A	IS C/B
5	9,0 (21 µM)	31,0 (64 µM)	67,0±1,4	7,0	2,1
6	30,0 (64 µM)	36,0 (77 µM)	>100,0	>3,3	>2,7
7	6,0 (14,5 µM)	7,8 (18,8 µM)	20,3±6,2	4,9	3,8
8.3	4,9	6,2	10,5±5,98	2,9	2,3
Chloroquine	0,02±0,008	0,074±0,02	3,4±0,5	155,0	42,0

*CI₅₀ (µg/ml); §CE₅₀ (µg/ml); ¥: Indice de selectivité

L'activité démontrée par la fraction 8.3 est modérée mais supérieure à celle des composés purs néanmoins elle présente un IS bas. Cette fraction est un mélange de stérols qui n'ont pas été identifiés et son activité peut être due à un composé particulier du mélange ou au synergisme de certains d'entre eux.

Les composés 7 et 5, possèdent une activité antipaludique modérée entre 5 et 10 µg/ml. Ces composés n'avaient pas été testés jusqu'à présent pour leur activité antipaludique.

III.5. *Dunalia brachyacantha* (Solanaceae)

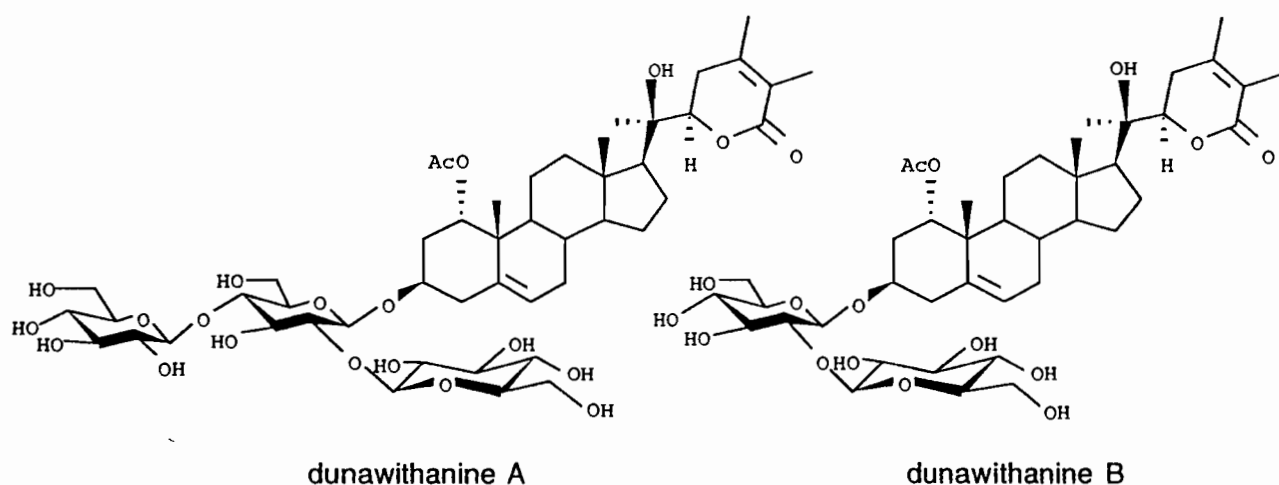
La purification des différents extraits provenant des feuilles et des racines de cette espèce a donné quatre produits dont deux actifs sur *Trypanosoma cruzi* et *Leishmania*, et deux à structure nouvelle mais inactifs.

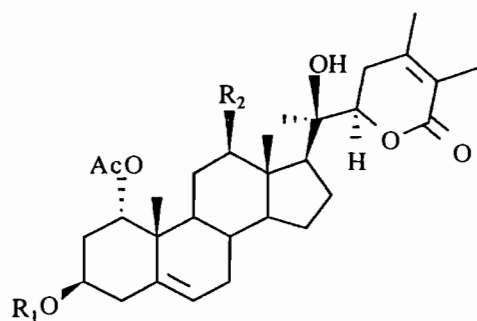
Cette espèce a déjà fait l'objet d'études phytochimiques mettant en évidence la présence d'un withanolide, la withaférine A dans les feuilles.⁸⁰

III.5.1. Etude bibliographique du genre *Dunalia*

Les composés isolés de *D. brachyacantha* dans notre étude se sont révélés être des withanolides. Plusieurs de ces composés ont été isolés antérieurement des espèces de *Dunalia* et parmi ceux-ci certains ont déjà fait l'objet de mesures d'activité: antifongique, antibiotique, cytotoxique, antitumorale, anti-inflammatoire, immunostimulante et insecticide.

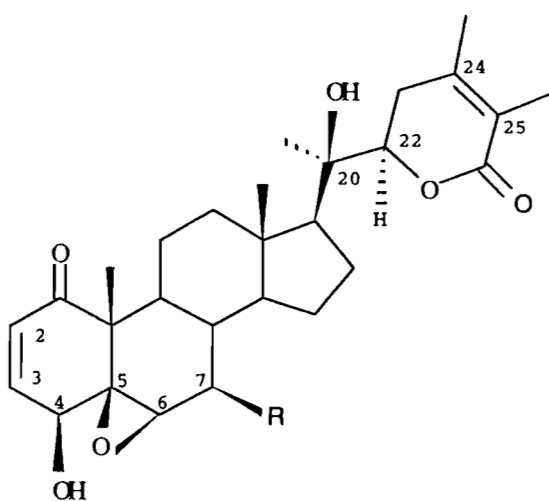
La chimie décrite pour le genre *Dunalia* inclue quatre espèces: *D. australis*, *D. tubulosa*, *D. arborescens*, *D. solanacea* (hormis *D. brachyacantha*). *Dunalia australis* contient les premiers withanolides glycosylés isolés: les dunawithanines A⁸¹ et B,^{81,82} et C, D, E et F.⁸²





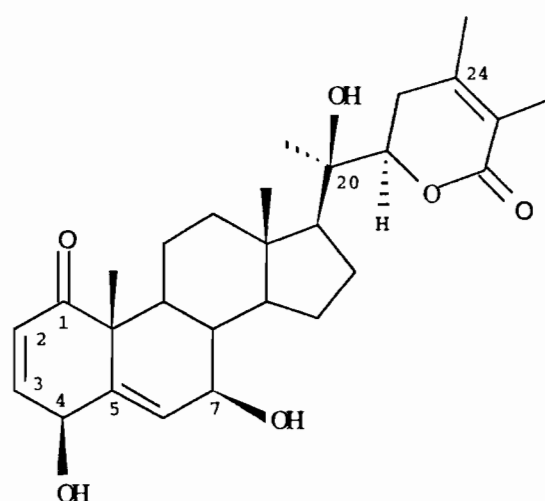
	R ₁	R ₂	dunawithanine
Xyl-4 Xyl-3	Glu	H	C
Glu-4 Xyl-3	Glu	H	D
Glu-4 Glu-3	Glu	H	E
Glu-4 Glu-3	Glu	OH	F

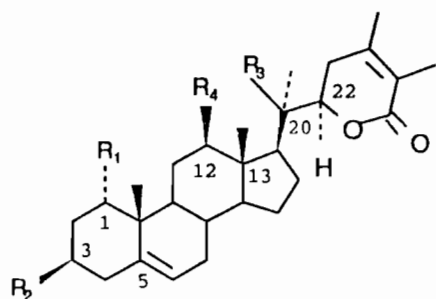
De *D. australis*, d'autres withanolides ont été isolés: le withanolide D,⁸³ le 7 β -acetoxywithanolide D,⁸¹ le 7 β -hydroxywithanolide D,⁸⁴ le 4 β ,7 β ,20 α (R)-trihydroxy-1-oxowitha-2,5,24-trienolide,⁸⁴ le (20R,22R)-3 β -acetoxy-1 α ,12 β ,20-trihydroxy-witha-5,24-dienolide,⁸⁵ le (20S,22R)-1 α -acetoxy-3 β -hydroxy-witha-5,24-dienolide,⁸⁵ le (20R,22R)-3 β -acetoxy-1 α ,20-dihydroxy-witha-5,24-dienolide,⁸⁵ le (20R,22R)-1 α -acetoxy-3 β ,20-dihydroxy-witha-5,24-dienolide⁸⁵ et le (20R,22R)-1 α ,3 β ,20-trihydroxy-witha-5,24-dienolide.⁸⁵ Le 7 β -acetoxywithanolide D a été également isolé de *D. arborescens*.⁸⁴



withanolide D, R=H

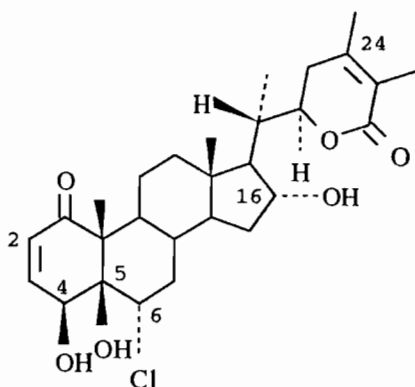
 7 β -hydroxywithanolide D, R=OH

 7 β -acétoxywithanolide D, R=OAc

 4 β ,7 β ,20 α (R)-trihydroxy-1-oxowitha-2,5,24-trienolide

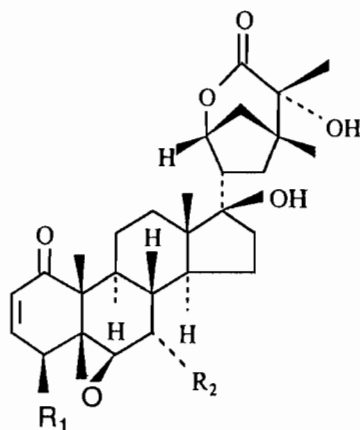


R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
OAc	OH	H	H
(20S,22R)-1 α -acétoxy-3 β -hydroxy-witha-5,24-dienolide			
OH	OAc	OH	OH
(20R,22R)-3 β -acétoxy-1 α ,12 β ,20-trihydroxy-witha-5,24-dienolide			
OH	OAc	OH	H
(20R,22R)-3 β -acétoxy-1 α ,20-dihydroxy-witha-5,24-dienolide			
OAc	OH	OH	H
(20R,22R)-1 α -acétoxy-3 β ,20-dihydroxy-witha-5,24-dienolide			
OH	OH	OH	H
(20R,22R)-1 α ,3 β ,20-trihydroxy-witha-5,24-dienolide			

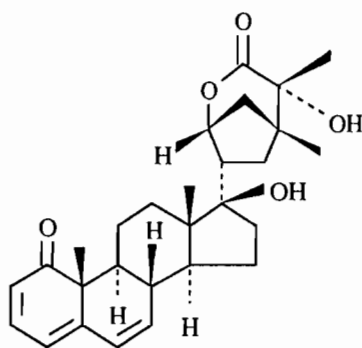
D. tubulosa contient le chlorohydrine 4 β ,5 β ,6 α -chloro-16 α -trihydroxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide,⁸⁶ et *D. solanacea*, contient les acnistines A, B, C, D et E,⁸⁷ et acnistines F, G et H.⁸⁸



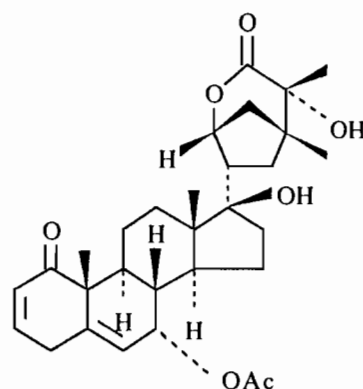
4 β ,5 β ,6 α -chloro-16 α -trihydroxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide



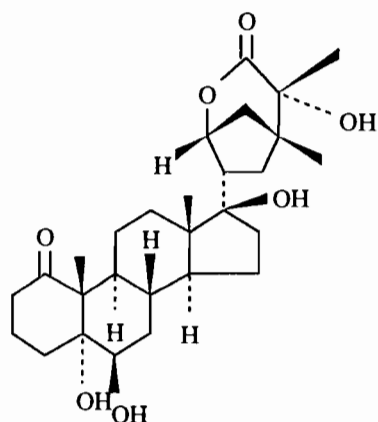
acnistine A, R₁=H, R₂=H
acnistine C, R₁=H, R₂=OAc
acnistine E, R₁=OH, R₂=H



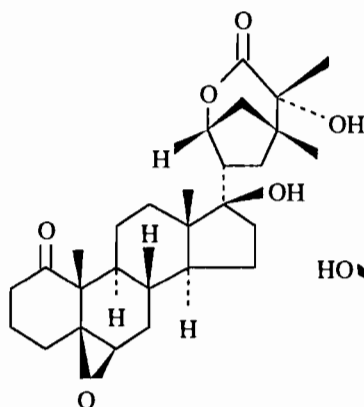
acnistine B



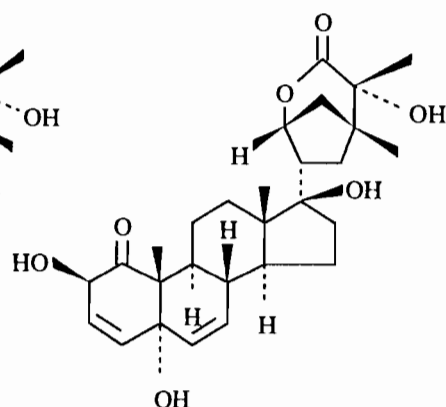
acnistine D



acnistine F



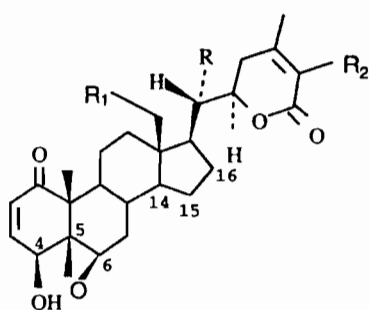
acnistine G



acnistine H

Plusieurs withanolides possèdent des activités biologiques. Ainsi *Withania somnifera* est une drogue Ayurvédique très valorisée et très populaire qui peut être comparée au “ginseng”, dû à diverses propriétés thérapeutiques: “antistress”, anti-inflammatoire, antitumorale, antibiotique et anticonvulsive.⁸⁹

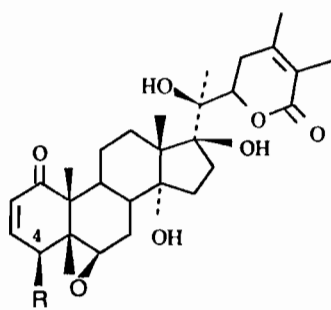
L'activité biologique des withastéroïdes a été révisée,^{89,90} et d'autres activités (antimicrobienne, hépatoprotectrice, immumodulatrice et antiappétante chez les insectes) ont été mises en évidence pour ce groupe de produits naturels.



withaférine A, R=CH₃, R₁=H, R₂=CH₂OH

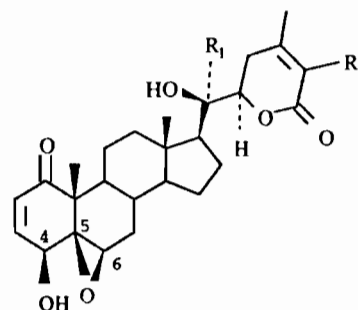
withacnistine, R=H, R₁=OAc, R₂=CH₃

withangulatine A,
R=R₁=H, R₂=CH₃, 14 α -OH, 15 α -OAc, Δ^{16}



4 β -hydroxywithanolide E, R=OH

withanolide E, R=H



withanolide D, R=R₁=CH₃

trans-dieq. chlorohydrine
de withaférine A, R₁=H, R₂=CH₂OH,
4 β -OH, 5 β -OH, 6 α -Cl

Activité antimicrobienne:

La withaférine A montre une activité contre les bactéries à gram positif, mais est inactive contre les bactéries à gram négatif, et les champignons non filamenteux. Par contre elle possède une activité antifongique contre *Aspergillus flavus*, *Epidermophyton floccosum*, *Cladosporium herbarum*.⁸⁹

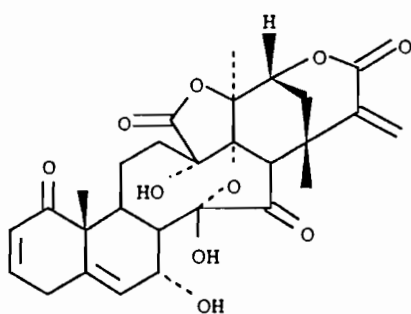
Activité cytotoxique:

La withaférine A et la withacnistine sont cytotoxiques sur les cellules KB. La withaférine A inhibe de façon significative la croissance des tumeurs du sarcome 180 (SA) à la dose de 20 mg/kg chez la souris, et du carcinosarcome intramusculaire Walker 256 (WM) à la dose de 20 mg/kg chez les rats.⁹¹ La withaférine A est responsable aussi de la diminution de la croissance du carcinome d'Ehrlich chez la souris et elle agit comme poison mitotique en arrêtant la division cellulaire en métaphase dans des cultures de cellules humaines du carcinome de larynx.

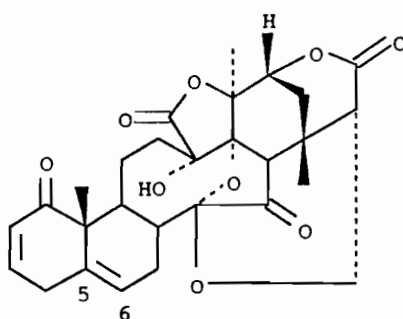
Plusieurs autres withanolides de structure proche à celle de la withaférine A ont été rapportés pour leur activité cytotoxique; parmi eux ceux qui méritent d'être cités sont: le 4 β -hydroxywithanolide E,⁸⁹ le withanolide E⁸⁹ et la *trans*-diéquatorial chlorohydrine de withaférine A.⁸⁹ Une activité anti-néoplasique du 4 β -hydroxywithanolide E⁸⁹ et de la withangulatine A isolés de *Physalis angulata* a été mesurée.⁸⁹

Les relations structure activité de la withaférine A et ses analogues, semblent être reliées à l'existence des fonctions époxyde et énone présents sur les cycles A et B, et à celle d'une lactone α,β -insaturée sur la chaîne latérale. Ces éléments semblent être indispensables pour la manifestation d'une activité antitumorale.⁸⁹

Le groupe des physalines: la physaline B,⁹² la 5 α ,6 α -époxyphysaline B⁹² (ou physaline J) et les physalines D,⁸⁹ A,⁸⁹ sont des cytotoxiques pour les cellules 9 KB, celles du mélanocarcinome B-16 et les cellules HeLa 229.

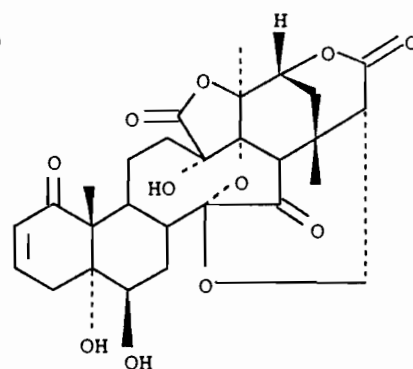


physaline A



physaline B

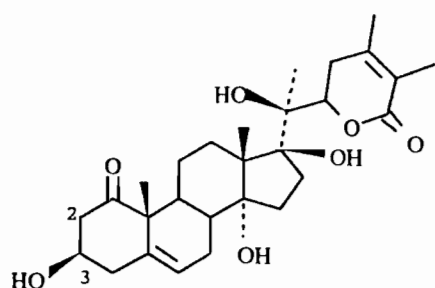
5 α ,6 α -époxyphysaline B,
= physaline j



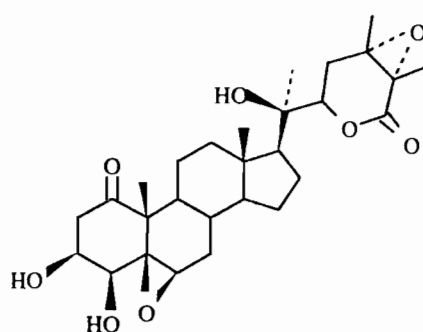
physaline D

Activité anti-inflammatoire:

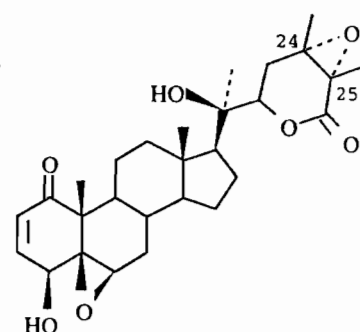
Le 3 β -hydroxy-2,3-dihydroxywithanolide F a été isolé par Budhijara et collab.,⁹³ et montre un effet comparable à celui de l'hydrocortisone. De plus, ces effets sont observés avec le physangulide et le 24,25-époxywithanolide D sur des inflammations exsudatives et prolifératives induites expérimentalement.



3 β -hydroxy-2,3-dihydroxywithanolide F



physangulide



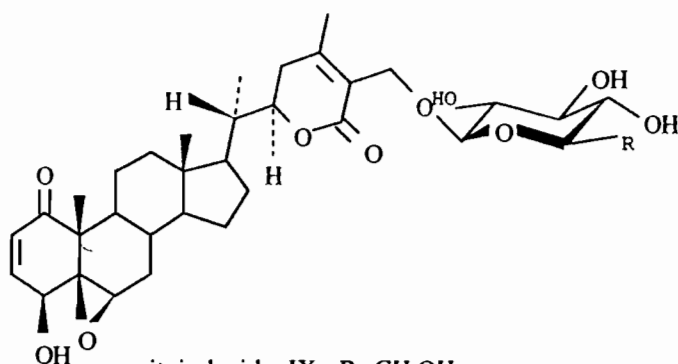
24,25-époxywithanolide D

Activité hépatoprotectrice:

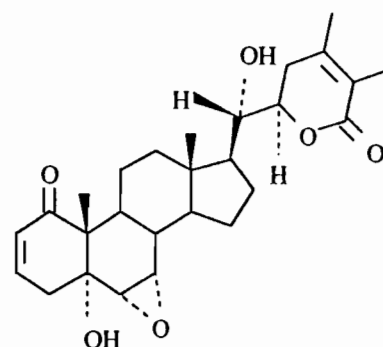
Le 3 β -hydroxy-2,3-dihydroxywithanolide F possède une activité hépatoprotectrice contre des dégâts induits par le CCl₄ qui est supérieure à celle de l'hydrocortisone.⁹⁴

Activité immunostimulante:

L'activité immunostimulante de la withaférine A⁸⁹ et des glycowithanolides: sitoindoside IX et X⁸⁹ a été mise en évidence. Une activité immunosuppressive est manifestée par le withanolide D⁸⁹ et la substance A⁹⁵ de Lycium.



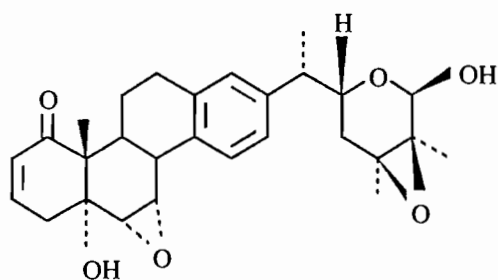
sitoindoside IX, R=CH₂OH
sitoindoside X, R=CH₂O(C=O)(CH₂)₁₄CH₃



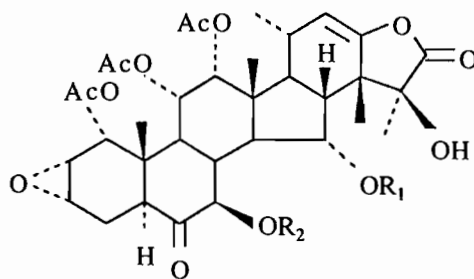
Lycium substance A

Activité insecticide:

Enfin la nicandrenone⁸⁹ possède des propriétés insecticides et le withanolide E⁸⁹ est antiappétant chez des insectes.



nicandrénone



taccalonolide A, $R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{H}$

taccalonolide B, $R_1 = R_2 = \text{H}$

taccalonolide C, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Ac}$

Activité antiparasitaire:

Les seuls withanolides antipaludiques sont les taccalonolides A, B et C, issus de la plante médicinale chinoise *Tacca plantaginea*, et décrits comme possédant une action contre des infections à *Plasmodium berghei* chez la souris.⁹⁶

III.5.2. Purification bioguidée des extraits

L'extraction bioguidée des feuilles de cette espèce a fourni plusieurs extraits actifs: ceux méthanoliques I et II de la première et seconde extraction, et celui éthéro-pétroléique de la première extraction. L'extrait hydroéthanolique provenant des racines s'est avéré inactif.

III.5.2.1. Extrait éther de pétrole du premier lot (I)

L'extrait éthéro-pétroléique I est actif contre *S. aureus* et *N. crassa*. Sa purification au moyen d'une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 (Schéma 14) fournit 4 fractions. Les fr. 3 et 4 se sont manifestées actives contre *S. aureus* (20 mm de diamètre d'inhibition) mais elles n'ont pas fait l'objet d'une purification ultérieure.

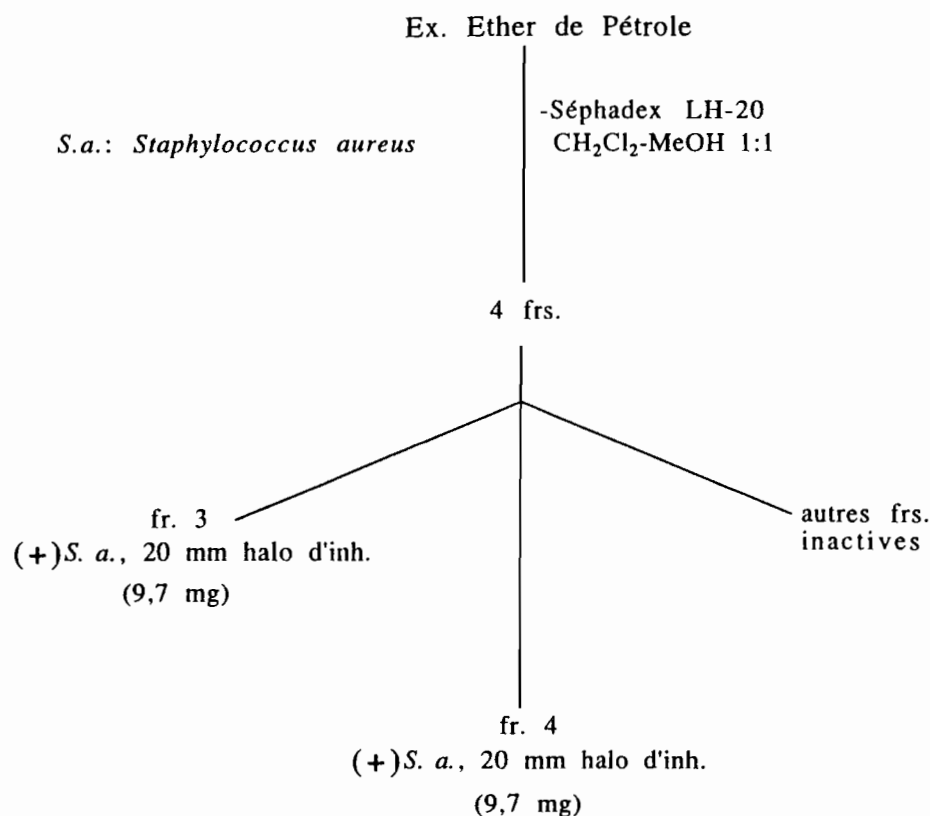


Schéma 14. Purification de l'extrait éthéro-pétroléique du premier lot de feuilles de *D. brachyacantha*

III.5.2.2.Extrait méthanolique du premier lot (I)

L'extrait méthanolique I est purifié sur Séphadex LH-20 élué par du MeOH. Des 6 fractions obtenues, les frs. 3 et 4 sont actives contre *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 20 mm. Une seconde séparation identique à partir d'une quantité plus importante d'extrait I (Schéma 15) confirme l'activité dans les fr. 3 et 7 (*S. aureus*, 20 mm de diamètre d'inhibition), et contre *Trypanosoma cruzi* dans la fr. 6. Cette fraction 6 est purifiée par CPP en 8 fractions qui ont été testées contre *T. cruzi*, *Leishmania brasiliensis*, *L. amazonensis* et *L. donovani*. La bande 5 (R_f 0,24 dans CH₂Cl₂-MeOH, 89:11) s'est révélée être la plus active contre les quatre souches testées avec une lyse totale des parasites à 1 µg/ml. La fr. 3 issue de la colonne de Séphadex active contre *S. aureus*, est résolue par CPP en six bandes dont la bande 1 (R_f 0,5) est active contre *N. crassa*, et la bande 5 (R_f 0,35) contre *T. cruzi*, *Leishmaniae* et *S. aureus*.

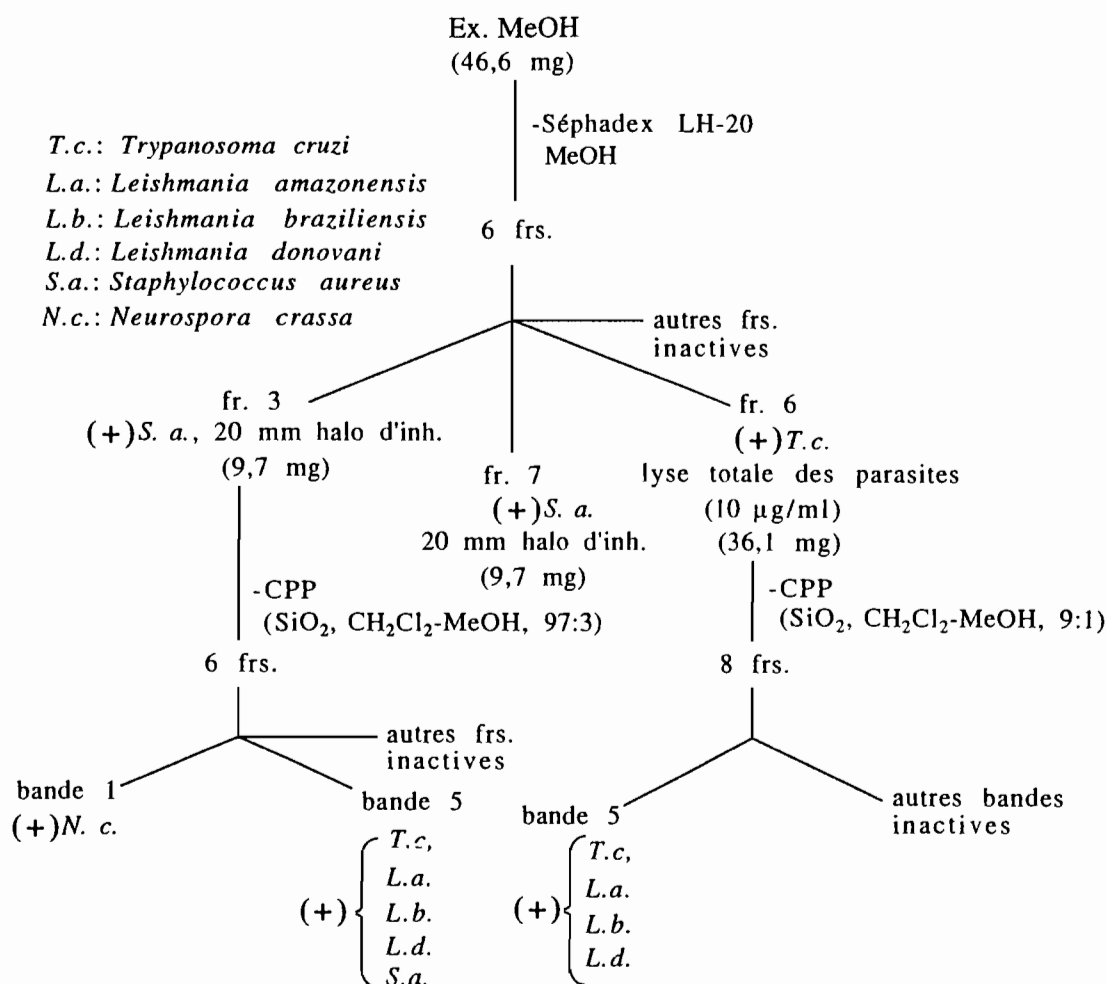


Schéma 15. Purification de l'extrait méthanolique I du premier lot de feuilles de *D. brachyacantha* (lot de Cochabamba)

III.5.2.3. Extrait méthanolique du deuxième lot (II)

Un échantillon sec de l'extrait méthanolique II a été purifié par chromatographie sur colonne de Séphadex LH-20 éluée par le MeOH, pour donner 13 fractions (Schéma 16). Les résultats des tests antiparasitaires sont reportés dans le Tableau 28.

L'activité antibactérienne de ces fractions a été évaluée contre des bactéries gram (+), et les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 29.

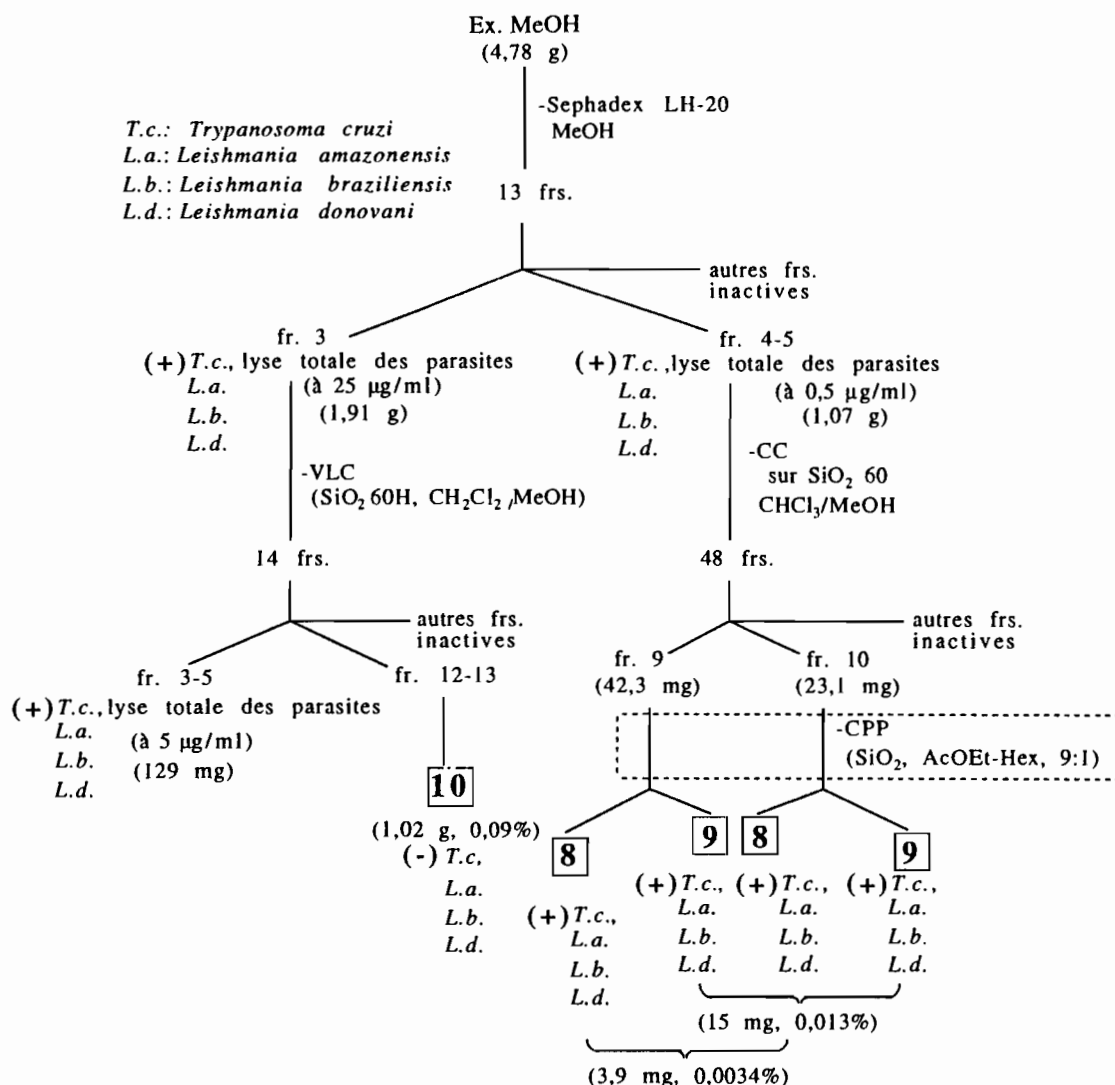
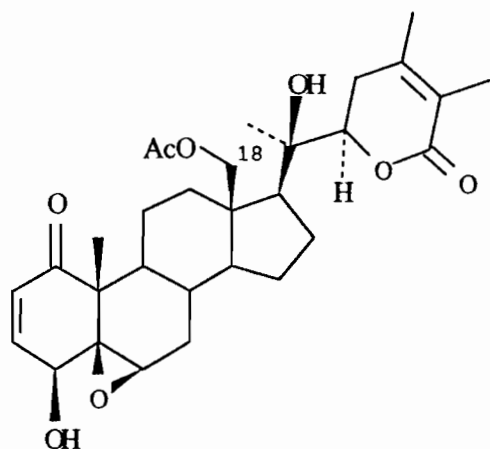


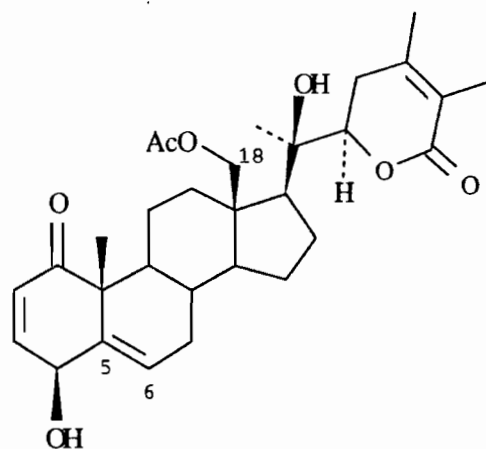
Schéma 16. Purification de l'extrait méthanolique du deuxième lot (II) de feuilles de *D. brachyacantha* (lot de La Paz)

D'après leur comparaison par CCM, les frs. 3, 4 et 5 qui sont parmi les plus actives, ont une composition comparable. Les fractions 4-5 ont été purifiées par une chromatographie sur colonne ouverte de silice normale pour fournir 48 fractions. Les fractions les moins polaires possèdent l'activité, comme cela a été signalé auparavant. Les fractions 9 et 10 ont été purifiées par CPP pour donner les composés majoritaires actifs: les composés 8 et 9. Les essais d'activité contre *T. cruzi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* et *L. donovani*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, ont montré que ces deux produits sont les agents leishmanicides, trypanocides et bactéricides (gram positif) de *D. brachyacantha*. (Tableau 30). L'analyse structurale a permis d'identifier 8 et 9 à des withanolides

que ces deux produits sont les agents leishmanicides, trypanocides et bactéricides (gram positif) de *D. brachyacantha*. (Tableau 31). L'analyse structurale a permis d'identifier **8** et **9** à des withanolides connus: le 18-acétoxywithanolide D⁹⁷ et le 18-acétoxy-5,6-déoxy-5,6-déihydro-withanolide D,⁹⁷ rapportés ici pour la première fois dans le genre *Dunalia*.



8 18-acétoxywithanolide D



9 18-acétoxy-5,6-déoxy-5,6-déihydro-withanolide D

Tableau 28. Activité trypanocide et leishmanicide des fractions de la colonne de Sephadex de l'extrait méthanolique II provenant des feuilles de *D. brachyacantha*.

Fraction (mg)	Espèces*				
	Conc.†	Tc§	Lb§	La§	Ld§
1 (17)	50	0	++	++	++
	25	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
2 (655)	50	+	+++	+++	+++
	25	0	+	+	+
	10	0	0	0	0
3 (1944)	50	+++	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++	+++
	10	0	+	++	+
4 (949)	50	+++	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++	+++
	10	+++	+++	+++	+++
5 (129)	50	+++	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++	+++
	10	+++	+++	+++	+++
6 (126)	50	+++	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++	+++
	10	0	++	++	++
7 (108)	50	+++	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++	++
	10	+++	+++	+++	++
8 (122)	50	+++	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++	+++
	10	0	+	0	+
9 (67)	50	0	0	0	0
	25	0	0	0	0
	10	0	0	0	0
10 (23)					
11 (10)					
12 (4)					
13 (3)					
Pentamidine		++	+++	+++	+++

* La = *Leishmania amazonensis*; Lb = *Leishmania braziliensis*; Ld = *Leishmania donovani*; Tc = *Trypanosoma cruzi*; †: en µg/ml; §0 = Nombre d'épimastigotes ou de promastigotes identique au contrôle; += 75% d'épimastigotes ou de promastigotes, avec peu de formes dégénératives; += 50% d'épimastigotes ou de promastigotes, avec peu formes dégénératives; +++= lyse totale des parasites; ||: Non testé

Tableau 29. *Activité antibactérienne des fractions de la colonne de Sephadex de l'extrait méthanolique II provenant des feuilles de D. brachyacantha.*

Fraction de Sephadex	Gram (+) ¥ (1,0 mg/ml)
1	-
2	-
3	17
4	24
5	23
6	13
7	12
8	15

¥ *Bs* = *Bacillus subtilis*, *Sa* = *Staphylococcus aureus*, diamètre d'inhibition en mm, frs. 9, 10, 11, 12 et 13 non testées

 Tableau 30. *Activité antiparasitaire et antibactérienne des 18-acétoxy-withanolide D (8) et 18-acétoxy-5,6-déoxy-5,6-déihydro-withanolide D (9),*

Composé	Espèces*				
	Conc. †	<i>Bs</i>	<i>Sa</i>	<i>Ec</i> ‡	<i>Sf</i> ‡
8	1,0	+	+		
	0,5	+	+		
	0,25	+	+		
	0,125	+	+		
	0,0625	+	-		
	0,0312	-	-		
9	1,0	+	+	-	-
	0,5	+	+	-	-
	0,25	+	+	-	-
	0,125	+	+	-	-
	0,0625	+	-	-	-
	0,0312	-	-	-	-
	Conc. ‡	<i>Tc</i> §	<i>Lb</i> §	<i>La</i> §	<i>Ld</i> §
8	50	++	+++	+++	+++
	25	0	+++	+++	+++
	10	0	++	+	+
9	50	+++	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++	+++
	10	+	+++	+++	+++
	1	0	++	+	+
	0,1	0	0	0	0

* *Bs* = *Bacillus subtilis*, *Sa* = *Staphylococcus aureus*, *Ec* = *Escherichia coli*, *Sf* = *Shigella flexneri*, *La* = *Leishmania amazonensis*; *Lb* = *Leishmania braziliensis*; *Ld* = *Leishmania donovani*; *Tc* = *Trypanosoma cruzi*; †: en mg/ml; ‡: en µg/ml; §0=Nombre de épimastigotes ou promastigotes identique au contrôle; +=75% épimastigotes ou promastigotes, avec peu de formes dégénératives; +++= 50% épimastigotes ou promastigotes, avec peu formes dégénératives; +++=pas d'épimastigotes ou promastigotes, lyse totale de parasites; ‡: Non testé pour 8

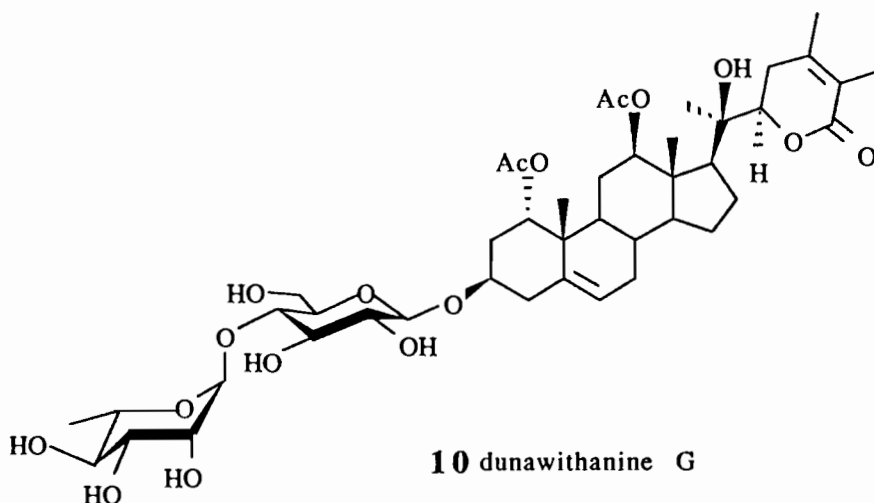
La fraction 3 (Schéma 16) qui provoque la lyse totale des parasites de *T. cruzi* à 25 µg/ml fut divisée en 14 fractions par un système de chromatographie liquide sous vide (VLC), les résultats des tests effectués sur ces fractions sont indiqués dans le Tableau 31.

Tableau 31. *Activité trypanocide et leishmanicide des fractions VLC issues de la fraction 3 Sephadex*

Fraction (mg)	Espèces*				
	Conc.†	Tc§	Lb§	La§	Ld§
1 (0,1)					
2 (0,1)					
3 (41)	25	+++	+++	+++	+++
	5	+++	+++	+++	+++
	0,5	+++	+++	+++	+++
4 (55)	25	+++	+++	+++	+++
	5	+++	+++	+++	+++
	0,5	+	++	+++	++
5 (33)	25	+++	+++	+++	+++
	5	0	++	+++	+
	0,5	0	+	+	+
6 (12)	25	+++	+++	+++	+++
	5	+++	+++	+++	+++
	0,5	0	+++	+++	+++
7 (7)	25	+++	+++	+++	+++
	5	+++	+++	+++	+++
	0,5	0	+++	+++	+++
8 (11)	25	+++	+++	+++	+++
	5	+	+++	+++	+++
	0,5	+	++	+	++
9 (10)	25	+	++	+++	++
	5	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0
10 (15)	25	+	++	+++	++
	5	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0
11 (139)	25	0	+	++	+
	5	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0
12 (596)	25	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0
13 (422)	25	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	0,5	0	0	0	0
14 (483)	25	++	+++	+++	++
	5	+	++	++	0
	0,5	0	0	++	0

*La = *Leishmania amazonensis*; Lb = *Leishmania braziliensis*; Ld = *Leishmania donovani*; Tc = *Trypanosoma cruzi*; †: en µg/ml; §0= Nombre d'épimastigotes ou de promastigotes identique au contrôle; ++= 75% d'épimastigotes ou de promastigotes, avec peu de formes dégénératives; +++= 50% d'épimastigotes ou de promastigotes, avec peu formes dégénératives; +++= lyse totale des parasites; ||: Non testé

Les fractions 3, 4 et 5 montrent la lyse totale des parasites de *T. cruzi* à 0,5, 5 et 25 µg/ml, mais ces fractions de faible masse et de composition complexe furent abandonnées. Les fractions 12-13 inactives sont constituées du composant majoritaire de l'espèce: le composé 10.



Le composé **10**, n'a pas manifesté d'activité biologique. Une nouvelle structure: dénommée la dunawithanine G a été établie pour le composé **10**.

III.5.2.4.Extrait hydroéthanolique des racines (2^e lot)

Bien que l'extrait hydroéthanolique des racines, se soit avéré inactif, celui-ci a été chromatographié sur silice normale dans l'espoir de découvrir de nouvelles structures de withanolides et de mieux comprendre les relations structure-activité de ces composés. Un nouveau composé: la dunawithanine H (composé **11**) a été isolé et sa structure établie d'après l'analyse spectrale de masse et RMN. Sur les 175 fractions obtenues de cette chromatographie, les fractions 54-61 renferment le composé pur **11** (Schéma 17).

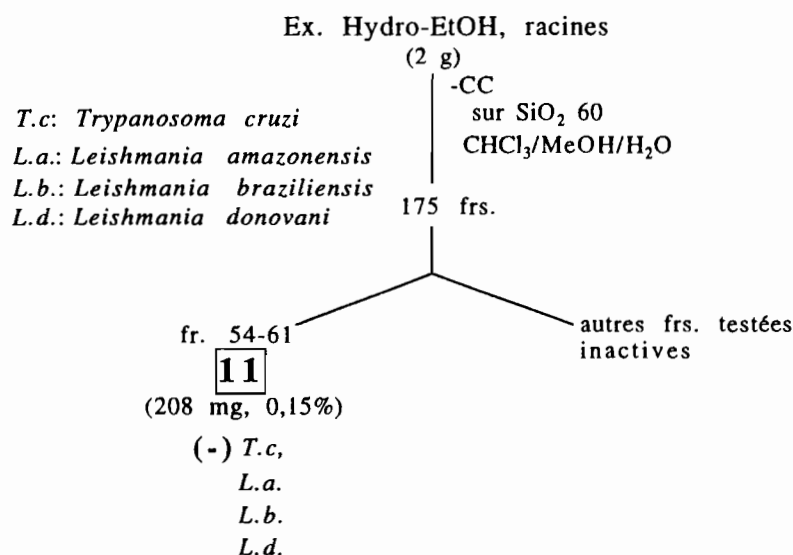
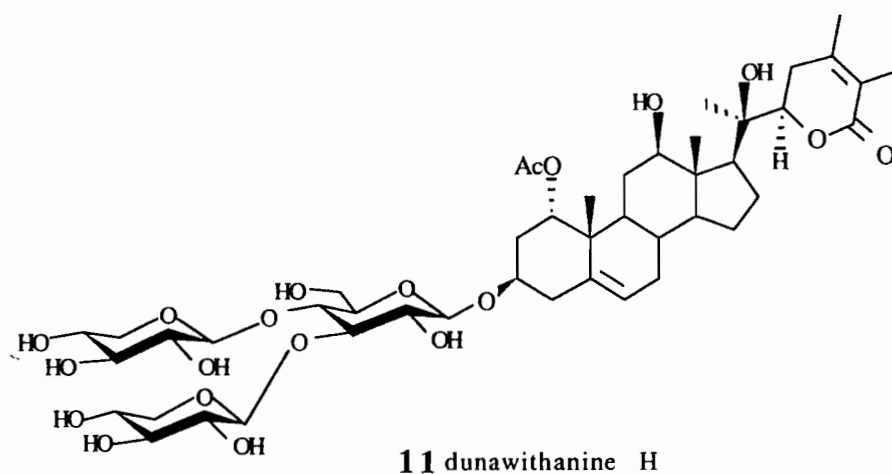


Schéma 17. Purification de l'extrait hydroéthanolique de racines de *D. brachyacantha* (lot de La Paz)



III.5.3.Conclusion

Jusqu'à maintenant, aucune activité biologique n'avait été rapportée pour **8** ou **9**. Ce sont les premières lactones stéroïdiques naturelles qui manifestent des propriétés leishmanicides et trypanocides. Les seuls withastéroïdes bioactifs connus et de structure proche sont le 20-deoxywithanolide D (testé contre des bactéries Gram [+]) et le withanolide D (cytotoxicité et activité immunosuppressive).⁸⁹ Le fait d'avoir trouvé une activité antibactérienne et antiparasitaire pour **8** et **9**, montre bien la similarité structurale de ces deux dérivés naturels avec le withanolide D et le déoxywithanolide D. Ceci pourrait laisser envisager aussi une possible similarité d'activité des cycles A et B (qui inclue la fonction cétone α,β -insaturée) et de la chaîne latérale (qui inclue le cycle δ -lactonique) comme dans le cas des withanolides antitumoraux.⁹⁰

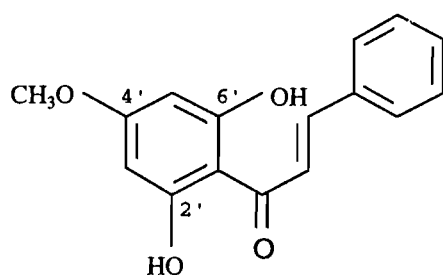
III.6. *Notholaena nivea* var. *flava* (Pteridaceae)

La purification des extraits obtenus au dichlorométhane a permis d'isoler quatre composés des feuilles de *Notholaena nivea* var. *flava*. Les structures sont connues. Deux possèdent une activité antifongique.

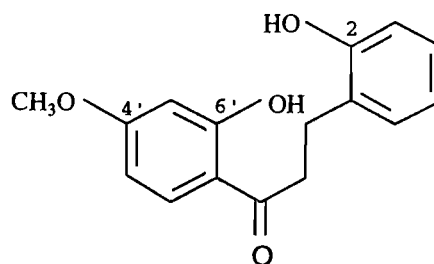
III.6.1. Etude bibliographique du genre *Notholaena*

La chimie du genre *Notholaena* est bien développée, en particulier celle relative à la caractérisation des flavonoïdes. Ainsi *N. affinis*, *N. aliena*, *N. aschenborniana*, *N. bryopoda*, *N. californica*, *N. candida*, *N. dealbata*, *N. delicatula*, *N. ekmanii*, *N. fendleri*, *N. galapagensis*, *N. grayi*, *N. greggii*, *N. incana*, *N. lemmonii*, *N. lemmonii* var. *lemmonii*, *N. limitanea*, *N. limitanea* var. *mexicana*, *N. neglecta*, *N. nivea* var. *nivea*, *N. pallens*, *N. palmeri*, *N. peninsularis*, *N. rigida*, *N. rosei*, *N. schaffneri*, *N. standleyi* et *N. sulphurea*, sont les espèces qui ont permis l'identification de 204 flavonoïdes appartenant à la famille des flavones, chalcones et flavanones. De ces mêmes espèces 14 triterpènes, 7 diterpènes, un monoterpène et deux dihydrostilbènes,⁹⁸ ont été mis en évidence. Il n'existe pas dans la littérature de travaux sur les activités biologiques manifestées par des extraits ou des composés purs issus des espèces de *Notholaena*.⁹⁸

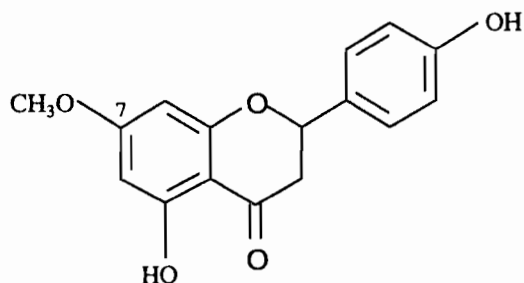
L'espèce *N. nivea* var. *flava* a été antérieurement étudiée et les composés flavonoïdiques suivants: les 2',6'-dihydroxy-4'-méthoxychalcone, 2,6'-dihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone, 7-O-méthylnaringénine et 7,4'-di-O-méthylnaringénine ont été isolés des feuilles.⁹⁹



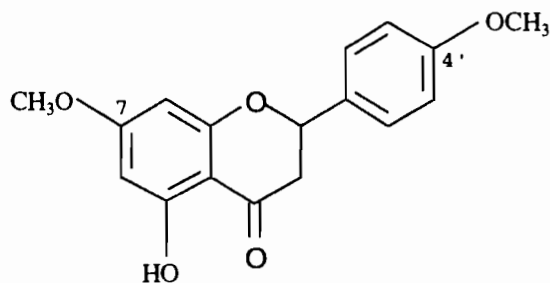
2',6'-dihydroxy-4'-méthoxychalcone



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



7-O-méthylnaringénine



7,4'-di-O-méthylnaringénine

Plusieurs usages médicaux traditionnels sont rapportés⁶⁴ pour certaines espèces telles que *N. flavens* et *N. nivea* considérées comme emménagogue (Argentine, Pérou), *N. sinuata* utilisée dans les troubles gastrointestinaux, les inflammations, comme expectorant et vermifuge (Mexique), les rhizomes de *N. sulphurea* secs utilisés contre les tumeurs (Pérou), et *N. tomentosa* employée comme abortif.

III.6.2. Purification bioguidée de l'extrait actif

Les composés de l'extrait CH_2Cl_2 des feuilles ont été séparés par chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex LH-20 eluée par le MeOH poursuivi de purifications par CPP (Schéma 18).

Les fractions 3-7 ont manifesté une inhibition de la croissance fongique pour des concentrations de 0,06, 0,03 et 0,016 mg/ml. La seule fraction active importante en poids est la fraction 3 (43 mg) qui fut séparée au moyen d'une CPP sur silice, pour fournir trois composés purs minoritaires, et une fraction majoritaire de composition très complexe. Les fractions 8 et 9 peu actives, sont pourtant les majoritaires en poids (115 et 82 mg).

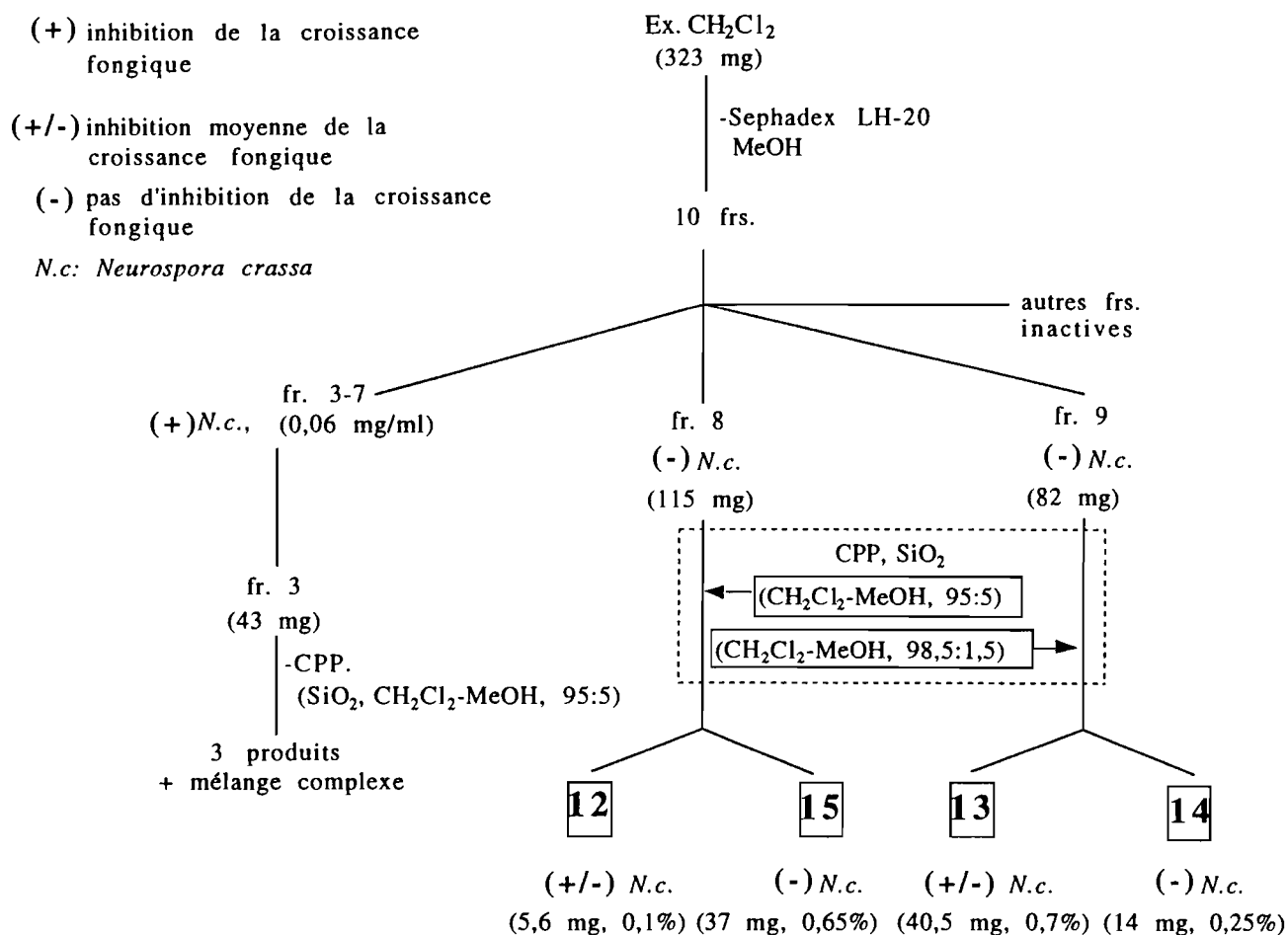
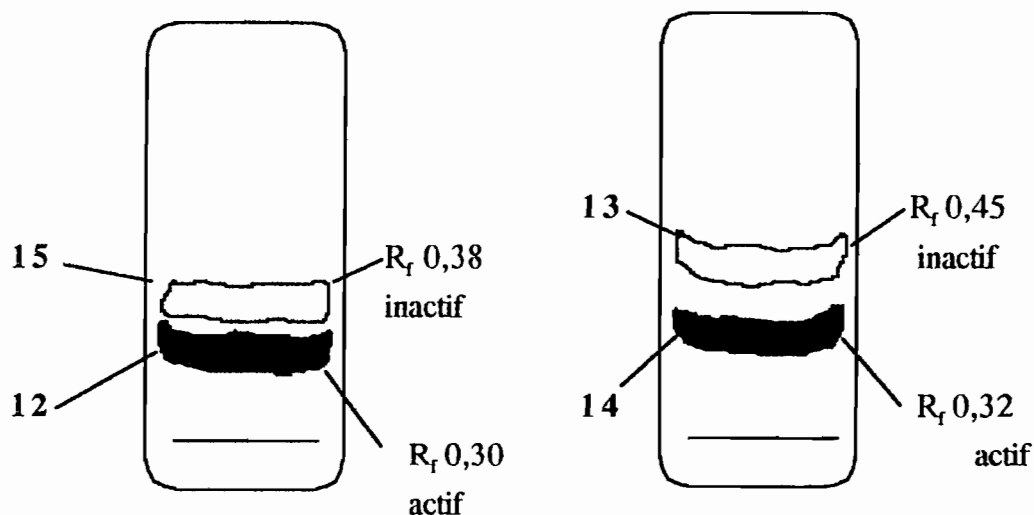


Schéma 18. Purification de l'extrait au dichlorométhane de feuilles de *N. nivea* var. *flava*

Ces fractions 8 et 9 ont été purifiées séparément par CPP (Figure 11). Par ordre de polarité décroissante, quatre composés purs ont été obtenus: **12** (R_f 0,30) et **15** (R_f 0,38) de la fraction 8, **14** (R_f 0,32) et **13** (R_f 0,45) de la fraction 9. Les composés **12** et **14** possèdent une activité antifongique. Ces composés actifs proviennent de fractions différentes de Séphadex, mais ils possèdent des R_f similaires.

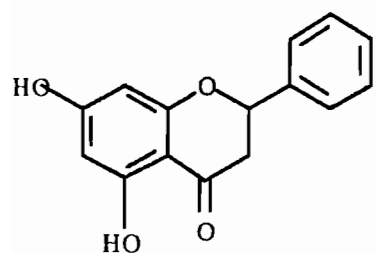
Parmi les quatre composés purifiés, **12** et **14** manifestent une activité antifongique et se retrouvent présents dans les fractions 3-7. Les analyses spectrométriques ont conduit à identifier **12** comme la pinocembrine, **13** à la pinostrobine, **14** comme la sakuranétine, et **15** comme 2',6'-dihydroxy-4'-méthoxy-dihydrochalcone.



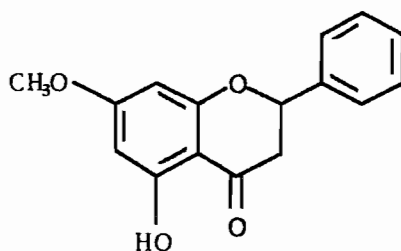
CPP de la fraction 8

CPP de la fraction 9

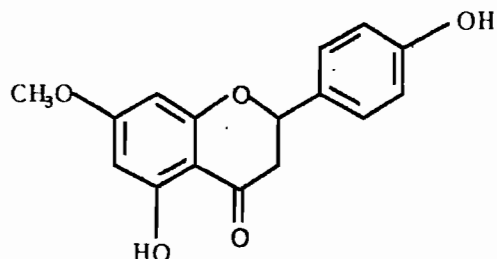
Figure 11. CPP des fractions 8 et 9 de l'extrait CH_2Cl_2



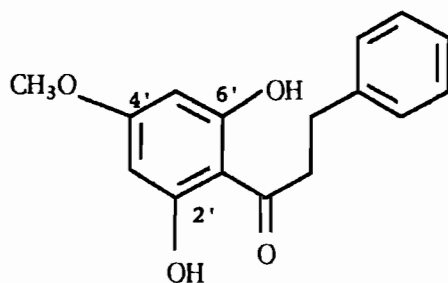
12 pinocembrine



13 pinostrobin



14 sakuranétine



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

Le Tableau 32, montre les résultats des tests réalisés sur les deux composés **12** et **14**. Ces résultats permettent d'attribuer à **12** et **14** une activité fongistatique plutôt que fongicide par rapport au médicament de référence, le kétoconazole.

Tableau 32. *Activité antifongique de la pinocembrine (12) et la sakuranétine (14) contre Neurospora crassa. Méthode de diffusion en boîte de Pétri*

Concentration*	12§	14§	kétoconazole§
3,13	20	20	40
1,56	16	20	40
0,78	16	20	40
0,38	15	20	40
0,18	13	20	40

*en µg/ml; §mm de diamètre d'inhibition

III.6.3. Conclusion

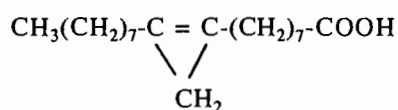
Les feuilles de *Notholaena nivea* var. *flava* contiennent 3 flavanones: la pinocembrine (**12**), la pinostrobin (**13**), la sakuranétine (**14**) et une dihydrochalcone: 2',6'-dihydroxy-4'-méthoxy-dihydrochalcone (**15**) apart celle décrite auparavant dans la littérature: la 2',6'-dihydroxy-4'-méthoxy-dihydrochalcone.⁹⁹ Les flavanones **12** et **14** possèdent une activité fongistatique. Malgré que le composé fongicide le plus actif de l'extrait CH₂Cl₂. n'a pas été identifié, l'activité antifongique manifestée par cet extrait peut être partiellement attribuée aux flavanones.

III.7. *Cavanillesia aff. hylogeiton* (Bombacaceae)

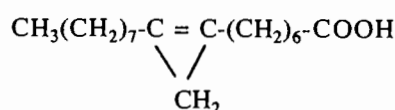
Le travail de purification mené sur les extraits de cette espèce a permis l'identification de quatre produits banaux. Aucun ne possède une activité biologique parmi celles ciblées.

III.7.1. Etude bibliographique du genre *Cavanillesia*

Le genre *Cavanillesia* n'a pas fait l'objet d'études approfondies en phytochimie. La chimie de la famille des Bombacaceae^{100,101,102} a été décrite dans plusieurs genres, et peut se caractériser par la présence de produits gras, très fréquemment des acides gras comme par exemple des acides palmitique, oléique et linoléique décrits dans *Ceiba pentandra* et *Bombax sessile*, ou de l'acide sterculique et l'acide malvalique dans *Adansonia digitata*, *Bombax oleagineum*, *Ceiba pentandra* et *C. acuminata*.



acide sterculique



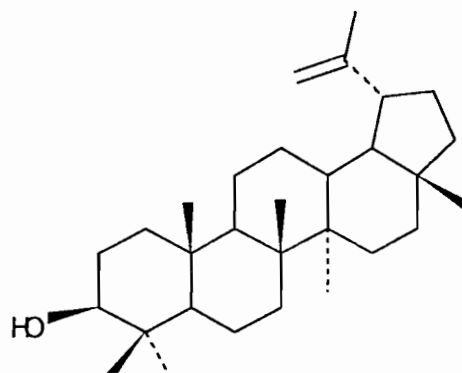
acide malvalique

Des glycolipides, polyphénols comme la quercétine, le kaempférol et l'acide caféique sont présents dans l'espèce *Ceiba pentandra*. Des quinones et naphthoquinones, et des triterpènes ont été rapportés pour *Bombax malabaricum*.¹⁰⁰

III.7.2. Purification bioguidée de l'extrait actif

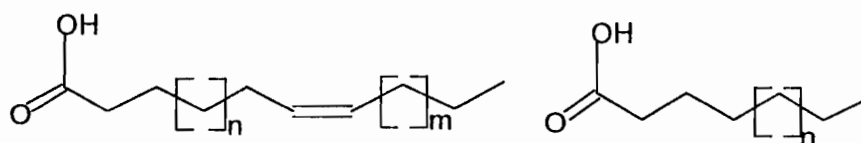
L'extrait CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie sur colonne de silice, en employant des mélanges CH_2Cl_2 -MeOH de polarité croissante pour obtenir un total de 25 fractions (Schéma 19). Les essais antipaludiques ont indiqué une inhibition totale < 1 µg/ml de la parasitémie de *P. falciparum*, pour les fractions 3 et 16, indicatrice d'une excellente activité antipaludique *in vitro*.

-La fraction 3 renferme un composé pur, dont les analyses spectroscopiques, ont permis de l'identifier au lupéol (composé 16).

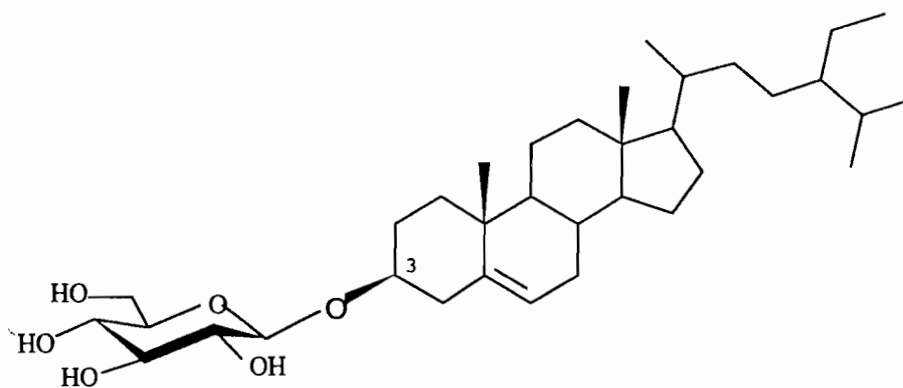


16 lupéol

-La fraction 16, la seconde fraction active, a été regroupée avec les fractions voisines pour former l'ensemble des fractions [14 - 22] de composition chimique similaire. Ce groupe a été déposé dans une CC de silice et 68 fractions ont été récoltées. La fraction minoritaire fr. 1, est constituée d'après son spectre de RMN ^1H de produits gras du type:

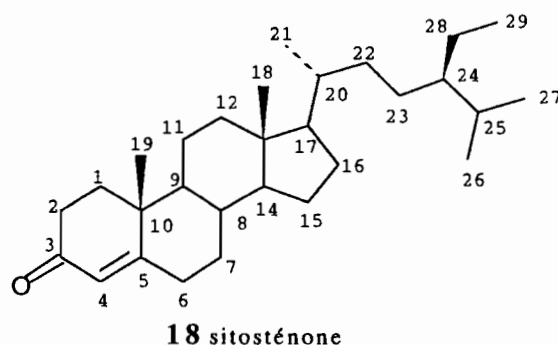
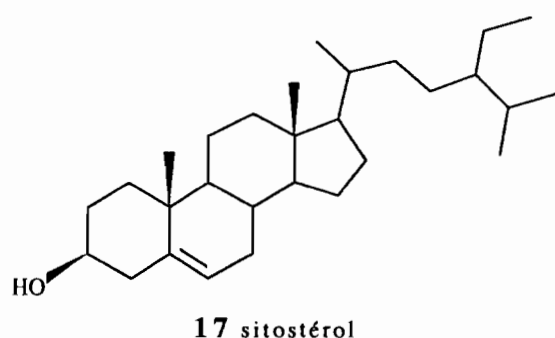


Les fractions 22 à 27 contiennent un produit majoritaire **19** élué de la colonne par lavage au MeOH et filtration sous forme d'un précipité blanc. Le composé **19** a été identifié au 3-O- β -glucopyranosyl β -sitostérol

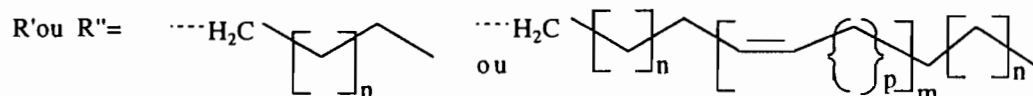
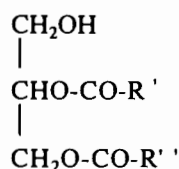


19 3-O- β -D-glucopyranosyl β -sitostérol

- Les fractions 7-9 inactives ont été purifiées par une CC sur silice et divisées en 135 fractions. Les regroupements des fractions obtenues 16-18 et 27-30 ont été ensuite purifiés par CPP pour fournir les composés **17** soit le β -sitostérol, et **18** la β -sitosténone en plus du lupéol (**16**).



-Les fractions 10-11 traitées par chromatographie sur CC de silice, ont permis la collecte de 109 fractions. Les regroupements des fractions 61-69 et 70-82 ont été purifiés par CPP, pour fournir le 3-O- β -D-glucopyranosyl β -sitostérol **19**, et des dérivés estérifiés du glycérol dont les structures n'ont pas été déterminées de façon définitive



Les résultats d'activité pour les composés purifiés et les mélanges de produits gras obtenus après ce schéma de purification ne sont pas en concordance avec les valeurs d'activité mesurées pour les extraits bruts et pour le composé **16** (Tableau 33). L'activité des fractions 3 (lupéol **16**) et 16 contre *P. falciparum*, correspondait à une CI_{50} de 1 $\mu\text{g/ml}$. La répétition des essais biologiques a permis de constater que le lupéol **16** ne possède plus l'activité contre *P. falciparum* indiquée auparavant, ce fait a pu être constaté aussi avec un autre échantillon de lupéol provenant d'une autre espèce (*Dypterix odorata*) extraite au laboratoire de Pharmacognosie à l'IBBA. Pour la seconde fraction dite active, la fr. 16 ($\text{CI}_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$), son composant majoritaire, le 3-O- β -D-glucopyranosyl β -sitostérol (**19**) et le

mélange de graisses qu'elle contient ont été testés; on observe une disparition de l'activité. Ces faits permettent de conclure que l'activité antipaludique rapportée *av initio* de l'espèce *Cavanillesia aff. hylogeiton* a été perdue au cours des séparations ou correspond à un "faux positif". Une contamination possible par des traces de solvant dans certaines étapes du protocole des tests biologiques pourraient engendrer une fausse activité *in vitro*. Le Tableau 33 résume les résultats des essais antipaludiques obtenus sur les composés purs et les mélanges de produits gras de *C. aff. hylogeiton*.

Tableau 33. *Résultats des tests antipaludiques avec des fractions et composés purs de Cavanillesia aff. hylogeiton*

Fraction*	CI ₅₀ (µg/ml) ¶	CI ₅₀ (µg/ml) †
essais préliminaires		
(1)	< 1	< 1
(2)	< 1	< 1
essais définitifs		
composé 16 (1)	> 20	> 20
acides gras (3)	> 20	> 20
composé 19 (4)	> 20	> 20
composé 18 (5)	> 20	> 20
acides gras (3)	> 20	> 20
acides gras (7)	> 20	> 20

*voir Schéma 19 pour l'attribution du numéro de fraction en italique entourée
 souches: ¶sensible à la chloroquine, † résistante à la chloroquine, méthode radioisotopique

IV. QUATRIÈME PARTIE

DÉTERMINATION DE STRUCTURE

IV.1.Introduction

Le travail de chimie structurale a permis l'identification de dix neuf composés. Parmi eux, cinq possèdent des structures nouvelles. La nature même de la recherche bioguidée peut conduire à des composés d'une grande diversité structurale. Ainsi, les composés isolés se situent dans des séries de composés d'origines biosynthétiques diverses: des composés phénoliques, des terpenoïdes, des stéroïdes, des withanolides, des flavonoïdes, et des composés lipidiques.

Du fait de la variété structurale des composés caractérisés, les techniques spectroscopiques utilisées, et les analyses et raisonnements suivis pour établir ces structures ont été particuliers à chaque cas. L'établissement des structures repose principalement sur la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectroscopie de masse (SM). Deux composés ont été dérivés par des réactions d'acétylation pour donner des composés peracétylés qui ont contribué à travers leur analyse spectroscopique à l'élucidation structurale de leurs précurseurs.

La présentation de la détermination de structure des composés suivra l'ordre d'exposition des plantes déjà établi dans les chapitres précédents, à savoir: *Senecio smithioides*, *Amburana cearensis*, *Qualea paraensis*, *Dunalia brachyacantha*, *Notholaena nivea* var. *flava* et *Cavanillesia* aff. *hylogeiton*.

IV.2.Généralités - Chimie structurale

Les structures des différents composés isolés ont été établies en utilisant fondamentalement la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H), du carbone 13 (RMN ^{13}H) et de corrélation internucléaire à une et deux dimensions. La spectroscopie de masse sous impact électronique et par différentes techniques de bombardement atomique a permis de corroborer les résultats déduits des analyses de RMN et d'apporter des argumentations supplémentaires à l'établissement des structures.

IV.2.1.Méthodologie de RMN

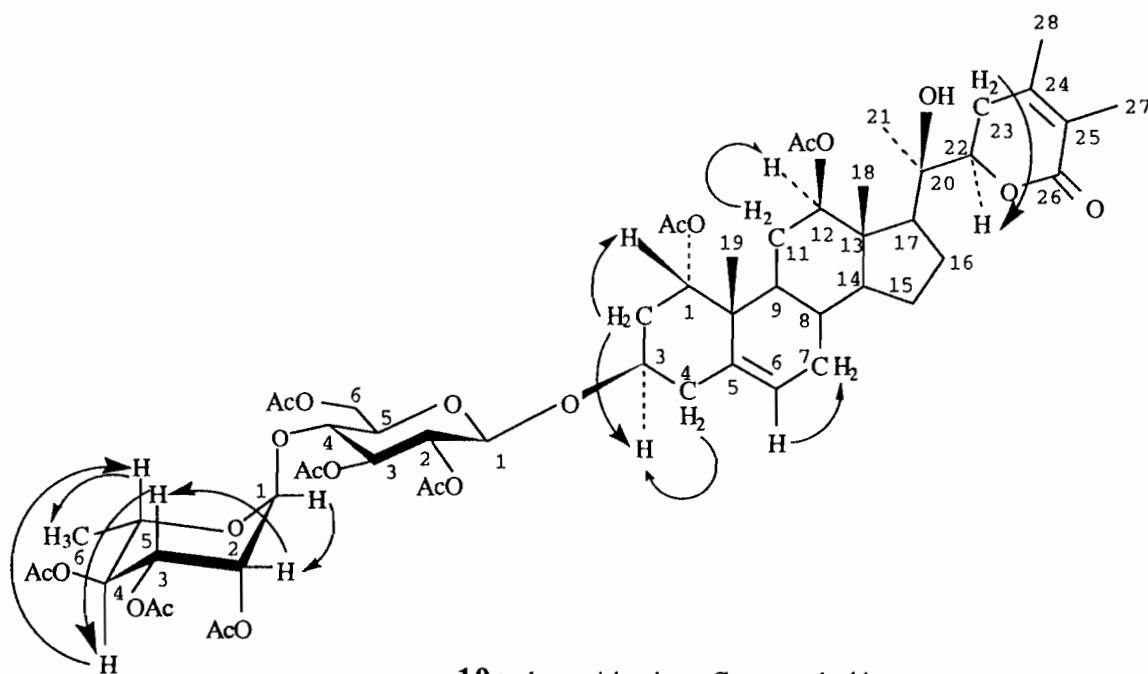
La RMN par ses diverses techniques à séquences multi-impulsionnelles à caractère homo- et hétéronucléaire, a permis dans la majorité des cas, l'attribution complète et sans ambiguïté des signaux des carbones et protons, et par conséquent la connaissance de la structure du composé analysé.

IV.2.1.1. Corrélation scalaire: spectroscopie COSY (Correlated Spectroscopy)

La COSY $H-H^{103}$ (Tableau 34) permet d'établir de manière simultanée toutes les corrélations homonucléaires protonées du type 2J (couplage geminal) et 3J (couplage vicinal) généralement supérieures au Hz.

Elle permet d'établir des corrélations de voisinage entre protons et donc d'obtenir des informations sur la structure moléculaire et son squelette protoné. La superposition des signaux obtenue sur le spectre proton à 1 dimension, est le plus souvent résolue dans les taches de corrélation qui se situent à des coordonnées différentes sur le spectre COSY à 2 dimensions. En conjonction avec l'expérience de corrélation homonucléaire totale HOHAHA, cette expérience permet l'établissement des déplacements chimiques correspondant aux systèmes couplés de spins, l'identification de leur raies et donc de leur multiplicité et ainsi la mesure des constantes de couplage.

La séquence d'impulsions est très simple dans ses deux variantes appelées COSY 90° et 45° . Elles sont composées de l'application de deux impulsions à 90° pour la première et à 90° ou 45° pour la seconde séparées par une période d'évolution t_1 incrémentable, suivie d'une période d'acquisition.



10a dunawithanine G peracétylée

Cette séquence aide dans l'élucidation structurale des withanolides à travers l'analyse des taches de corrélation comme dans le cas de la dunawithanine G peracétylée (**10a**), obtenue à partir des feuilles de *Dunalia brachyacantha*. Dans le cas des withanolides glycosylés, l'expérience COSY permet

d'identifier les différentes unités osidiques. Le système de spins de chaque sucre peut être établi par la l'enchaînement des taches de corrélation à partir du signal du proton anomérique en déterminant ainsi le déplacement chimique et la multiplicité de chaque proton osidique sur la projection 1D. La carte COSY constitue un complément des expériences de corrélation hétéronucléaire dans l'attribution des signaux protons.

IV.2.1.2. *Corrélation totale: spectroscopie HOHAHA (Homonuclear Hartmann-Hahn)*

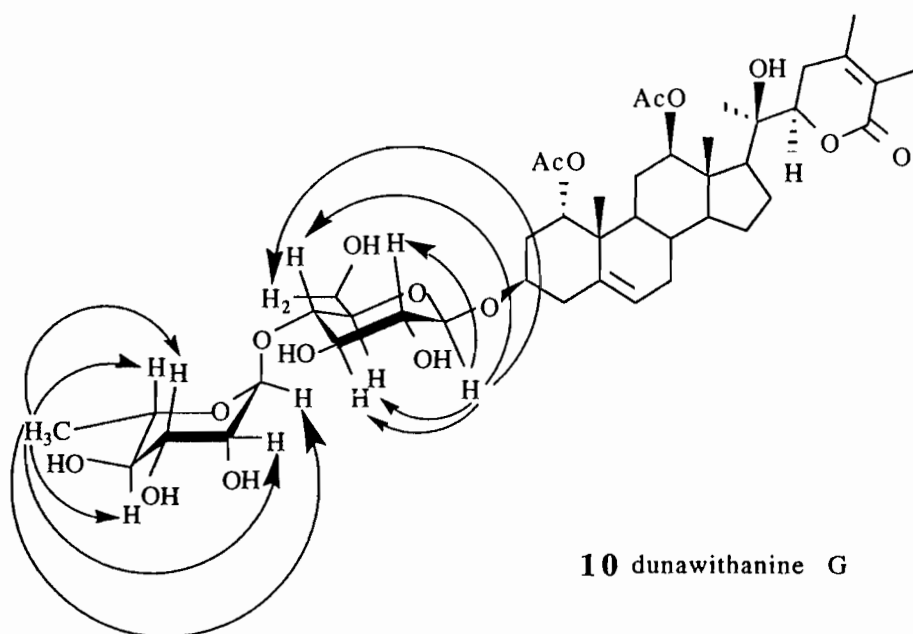
Cette expérience^{103,104} (Tableau 34) permet de détecter le transfert de magnétisation entre protons non couplés directement. Ce transfert devient nécessaire pour connaître l'environnement protoné global d'un proton donné. Cette expérience est capable d'étendre le réseau des corrélations plus loin que l'expérience précédente COSY. L'HOHAHA ou TOCSY (T^OTal C^Orrélation S^Pectroscop^Y) constitue l'alternative aux séquences COSY relayées à transfert cohérent (relayé via le couplage spin-spin scalaire¹⁰³) qui ont l'inconvénient que le signal détecté est de plus en plus faible en augmentant le nombre de relais.

L'expérience HOHAHA permet l'établissement de cohérences avec des spins plus distants en utilisant des méthodes comme celle des champs de verrouillage de spin (spin-locking fields, SL). La séquence SL utilisée au laboratoire constitue une modification de la séquence MLEV-16 appelée MLEV-17 qui inclue une impulsion 180°_x après la dernière impulsion composite de 180° du MLEV-16, servant à enlever une erreur de phase entre le vecteur et l'axe x à la fin du cycle MLEV-16 (trim-pulses). Cette expérience a été enregistrée en détection inverse c'est-à-dire, émission des impulsions proton et du spin-lock par le canal du découpleur.

Cette expérience permet d'individualiser les systèmes couplés à partir de l'un des protons contenus dans chaque système. Son interprétation est facilitée lorsque ce proton est isolé, facilement repérable et attribuable à une fonction chimique. Elle permet de résoudre des ambiguïtés d'attribution résultant de l'analyse du spectre COSY.

L'utilité pratique de cette technique est démontrée pour l'élucidation structurale d'hétérosides¹⁰⁵ où on applique la séquence afin de visualiser les corrélations de chaque système de spins osidiques isolé. Les unités osidiques représentent des systèmes fermés à 5, 6 ou 7 spins. Nous avons ainsi utilisé cette technique pour l'identification des unités osidiques des withanolides glycosylés de *Dunalia brachyacantha*.

Dans le cas de la dunawithanine G (**10**), les protons osidiques individualisés qui vont permettre l'analyse du spectre HOHAHA sont les deux protons anomères (déplacement chimique déblindé par rapport aux autres H osidiques) et les protons du méthyle du rhamnose. A partir de chaque H-1 osidique, on observe une tache de corrélation avec chaque proton osidique appartenant à la même unité (glucose ou rhamnose). Ainsi le proton anomère du glucose présentera 6 taches de corrélations avec les protons H2 et H6, qui permettra de confirmer ou de mesurer les valeurs de déplacements chimiques et de multiplicité non obtenus par l'analyse du spectre COSY du fait de la forte superposition des signaux osidiques.

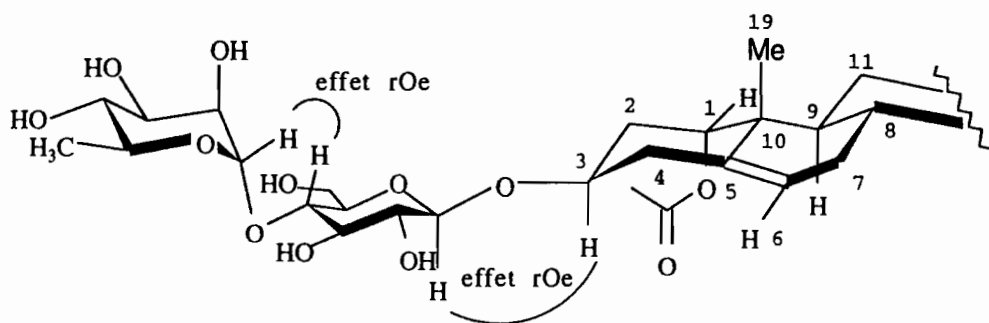


IV.2.1.3. Corrélation vectorielle: spectroscopies NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) et ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy)

En opposition avec la détection du phénomène de couplage à travers des liaisons qui se passent dans le plan xy, existe le phénomène de relaxation spin - réseau par transfert d'énergie excédente du spin à l'ensemble du système, sous la forme d'énergie calorifique. L'effet produit à travers l'espace contient l'information en regard à la distance entre spins. Cette relaxation se réalise par une interaction dipôle-dipôle ou relaxation croisée. Dérivé de la relaxation croisée apparaît l'effet nucléaire Overhauser (NOE) qui consiste en une modification de l'intensité de la résonance du spin X lorsque le spin A est soumis de façon continue à l'application d'un champ de radiofréquence entraînant la saturation de la résonance électronique de A car les transitions de A sont induites de façon incessante. La séquence NOESY permet l'observation de tous les NOE transitoires simultanément et consiste en la séquence

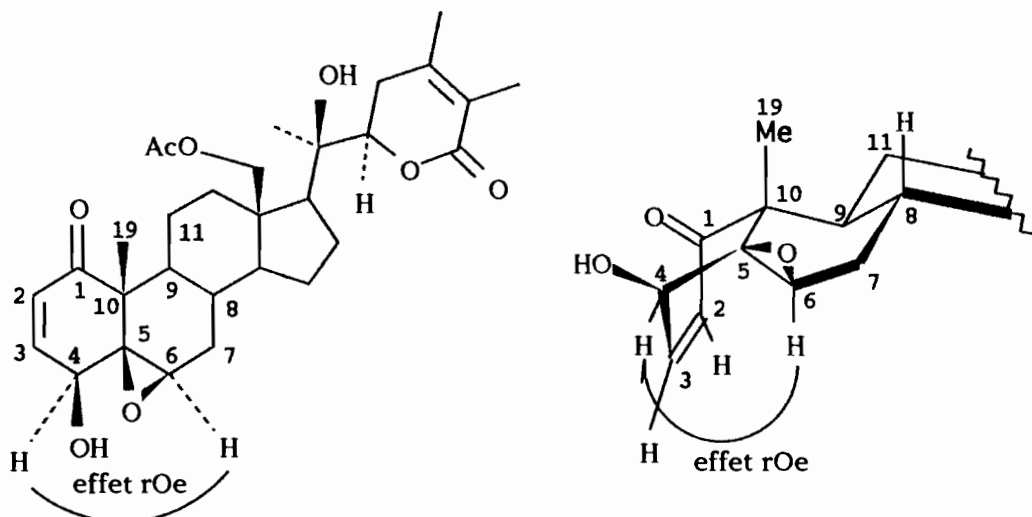
d'impulsions suivante: $90^\circ - t_1 - 90^\circ - t_m - 90^\circ$ - acquisition. Le temps de mixage t_m est la période où s'effectue l'échange de magnétisation dû à l'effet Overhauser. Dans la séquence ROESY^{103,106} (Tableau 34) on détermine les effets dûs à la relaxation croisée transversale, contrairement à ceux de relaxation croisée longitudinale détectés par la séquence NOESY.

Les effets NOE peuvent devenir très faibles, dans certaines molécules ils peuvent être positifs ou négatifs et passer par zéro en liaison avec le temps de corrélation moléculaire (τ_c). En revanche, les effets de relaxation croisée transversale (ROE) restent toujours positifs. Suite aux problèmes de défocalisation ou refocalisation partielle par couplage scalaire induits par les phénomènes de modulation des échos de spin, une expérience de spin-lock identique à celle de la séquence HOHAHA, est préférée. L'exploitation des taches d'interaction du spectre NOESY garde un rapport avec la proximité spatiale des noyaux protons. Lors de l'absence de corrélation scalaire pour l'établissement du voisinage d'un atome, l'alternative constitue la NOESY/ROESY, qui montrera le rapport désiré. L'enchaînement des unités osidiques des withanolides glycosylés peut être élucidé en trouvant le rapport entre le proton anomérique et quelconque autre proton (non anomérique) du sucre substitué. La localisation du point d'attachement de la chaîne osidique sur la génine peut être réalisée à travers la liaison acétalique.



Séquençage et fixation de la chaîne osidique pour dunawithanine G **10**

Une analyse de la proximité de deux protons par la mise en évidence d'une relaxation croisée longitudinale ou transversale permettra dans certains cas de définir les configurations relatives, de deux centres chiraux. Pour le 18-acétoxy withanolide D **8**, un effet ROE est détecté par l'observation d'interaction entre H-4 et H-6 ce qui permet de définir les configurations β pour les fonctions époxy et hydroxy des carbones chiraux C-4 et C-6.

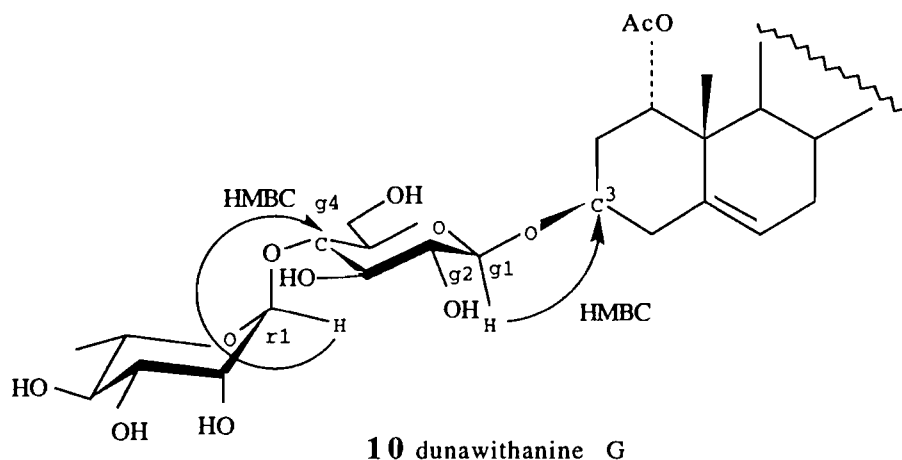
**8** 18-acetoxywithanolide D

IV.2.1.4. Corrélation hétéronucléaire directe: spectroscopies XHCORR (XHCORRelated spectroscopy) et HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), et distante: COLOC (CORrelation by LONG range Coupling) et HMBC (Heteronuclear Multiple-Bound Correlation)

Les expériences bidimensionnelles XHCORR^{103,104,106} et HMQC¹⁰⁷ (mode inverse), (Tableau 35) appelées aussi COSY-XH, permettent d'obtenir des cartes 2D où les taches de corrélation correspondent aux couplages $^1J_{CH}$. Cette information devient très utile pour l'attribution des signaux du spectre carbone à partir des signaux des protons dont l'identification a été faite au préalable d'après les cartes COSY H-H ou HOHAHA. Egalement la relation inverse peut se faire quand certains signaux protons restent inconnus alors que le spectre carbone a déjà été attribué. Ces expériences permettent de superposer le squelette protoné au squelette carboné de la molécule.

L'outil le plus efficace pour l'assemblage final du squelette hydrocarboné constitue les expériences de corrélation hétéronucléaire distante COLOC¹⁰³ et HMBC¹⁰³ (mode inverse). Les taches de corrélation dans la carte 2D correspondent à des couplages du type $^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$, parfois $^4J_{CH}$ à travers les liaisons reliant le proton aux carbones environnants.

L'intérêt de ces expériences (HMBC ou COLOC) pour les hétérosides comme dans le cas de la dunawithanine G **10**, est qu'elles permettent d'établir les sites de fixation des chaînes osidiques et les points de séquençage dans ces chaînes.



Comme illustration de l'application des expériences de corrélation hétéronucléaire, la Figure 12 montre les principales corrélations relevées sur le spectre HMBC du triterpène 3 β -acétoxyurs-12-en-11-one (**5**). Chaque groupement protoné méthylique possède 3 ou 4 corrélations avec les carbones formant le trépied qui porte le méthyle.

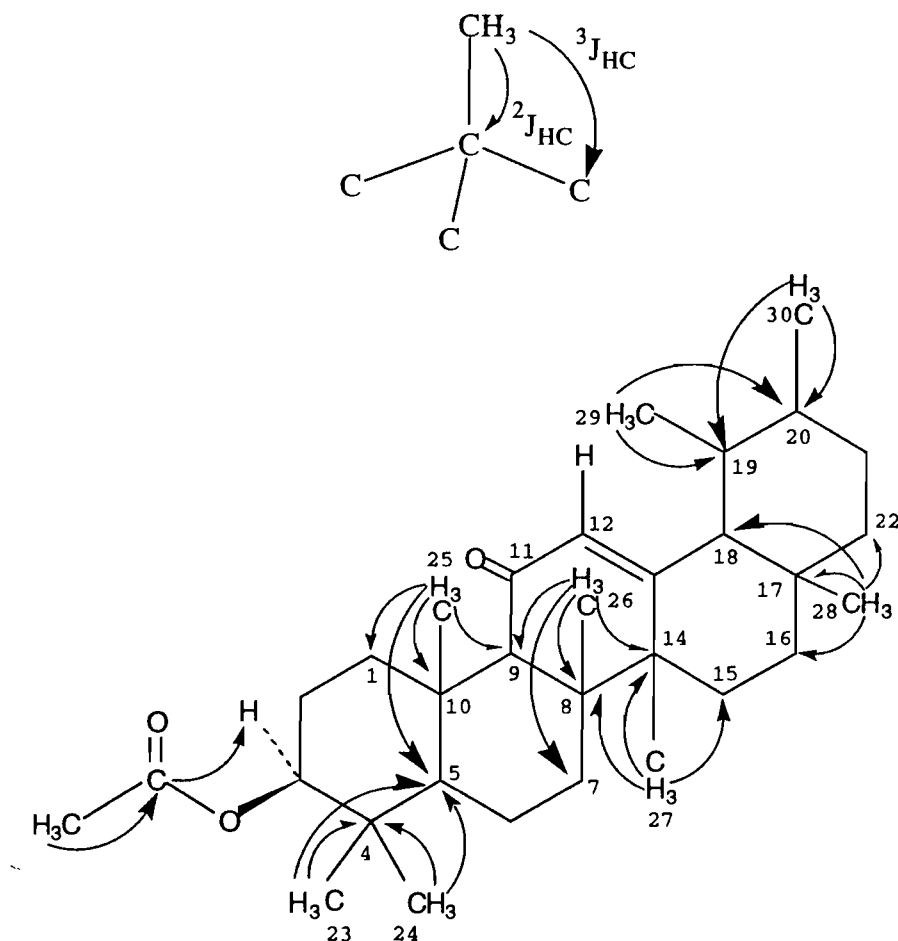
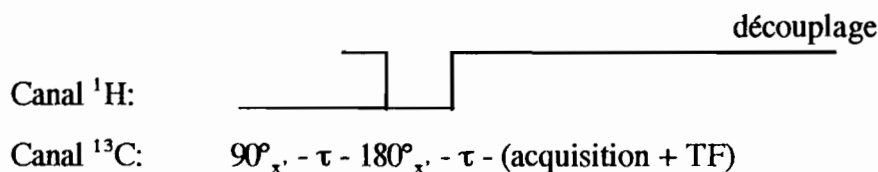


Figure 12. *Corrélations hétéronucléaires des méthyles, et de l'acétate dans le 3 β -acétoxyurs-12-en-11-one 5 (spectre HMBC)*

Ces corrélations ont permis d'établir l'assemblage du squelette cyclohydrocarboné. Ces expériences permettent d'observer des couplages $^3J_{CH}$ à travers un hétéroatome d'une liaison. Une telle corrélation entre le H-3 et le carbonyle de la fonction acétyle permet d'établir la localisation de l'acétate sur le squelette cyclohydrocarboné.

IV.2.1.5. Expériences hétéronucléaires monodimensionnelles, JMOD (*J-MODulated spin-echo experiment*) et DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)

L'expérience dite J-modulé¹⁰⁷ suivie par un spin-echo (JMOD) également appelée la technique SEFT (Spin Echo Fourier Transform), permet d'obtenir un spectre de carbone ^{13}C découplé avec des pics en phase ou en anti-phase selon le nombre de protons portés par chaque carbone. Ainsi, les carbones CH_2 et les carbones quaternaires se représentent par des pics du même côté (positifs ou négatifs) et les carbones CH_3 et CH par des pics opposés aux précédents (négatifs ou positifs). Cette différenciation est utile pour l'attribution de signaux carbones où on détermine si chaque carbone est impair (1H ou 3H) ou pair (0H ou 2H). La séquence d'impulsions est la suivante:



La valeur de τ est égale à $1/J(C,H)$. L'impulsion 180°_x , permet d'éliminer l'effet des différentes fréquences de Larmor (déplacements chimiques de chaque carbone) et garde seuls les effets des couplages C,H.

A partir du spectre de carbone ^{13}C découplé, grâce à l'expérience DEPT, nous pouvons obtenir trois sous-spectres: le premier renferme les signaux CH , CH_2 et CH_3 , le second donne uniquement les signaux CH , et le troisième fournit les CH et CH_3 positifs avec les CH_2 négatifs. Ces trois sous-spectres sont obtenus en faisant varier la valeur de l'impulsion Θ_y , (45° , 90° et 135°) dans la séquence de l'expérience DEPT¹⁰⁷

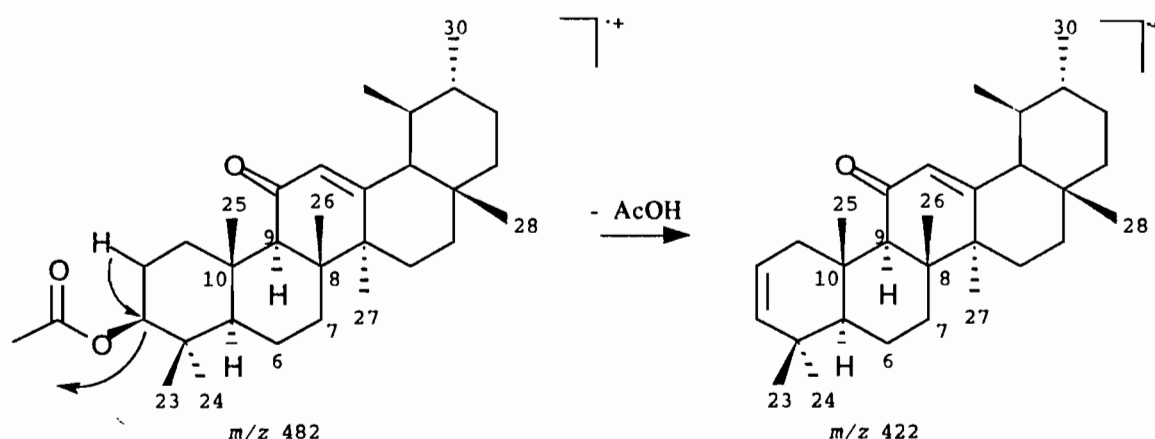
Canal ^1H : $90^\circ_{x'} - \tau - 180^\circ_{x'} - \tau - \Theta_{y'} - \tau$ - découplage

Canal ^{13}C : $90^\circ_{x'} - \tau - 180^\circ_{x'} - \tau$ - (acquisition + TF)

L'intensité des raies pour chaque type de carbone dépend de l'angle θ selon des fonctions sinusoïdales. Pour $\theta = 90^\circ$ (DEPT 90), l'intensité maximale correspond aux raies des CH et on obtient le sous-spectre des carbones CH. Pour $\theta = 135^\circ$ on obtient un spectre avec des signaux des CH_2 négatifs et les signaux CH et CH_3 positifs. La soustraction du second sous-spectre (90°) au troisième (135°) fournit un sous-spectre où les CH_2 sont négatifs et les CH_3 positifs. Les carbones quaternaires sont identifiés sur le spectre ^{13}C découplé par comparaison avec le premier sous-spectre. En routine, la réalisation du DEPT (90) et DEPT (135) en plus du spectre de carbone 13 total, est suffisant pour l'identification du degré de protonation de chaque carbone. L'avantage de l'utilisation de la séquence DEPT sur l'expérience J-modulé est la possibilité de bien différencier les CH des CH_3 . Par contre l'expérience JMOD ne nécessite qu'une seule série d'accumulations en opposition aux trois spectres nécessaires de l'expérience DEPT.

IV.2.2. Spectrométrie de masse

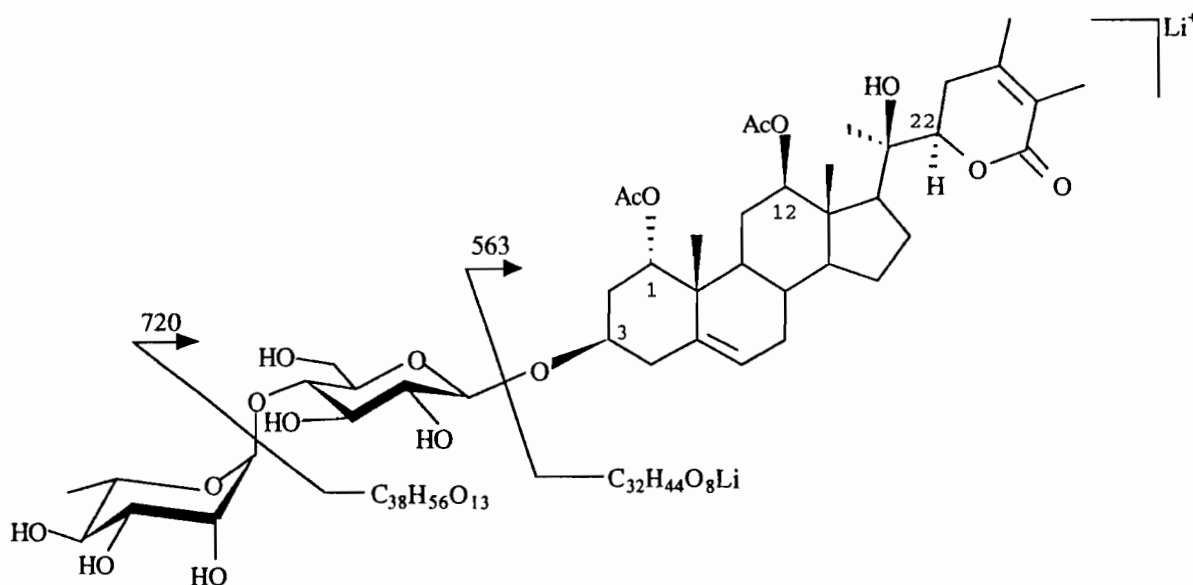
La technique de spectrométrie de masse par impact électronique (SM-IE) ¹⁰⁸ est utilisée pour des molécules volatilisables et permet l'obtention de l'information sur la masse moléculaire et sur des fragments.



obtention du fragment $m/z \ 422$ par coupure du groupe acétate
à partir de l'ion moléculaire dans le 3 β -acétoxyurs-12-en-11-one **5**

L'obtention de l'ion moléculaire de composés peu volatils, peut se faire par des méthodes d'ionisation par bombardement d'atomes rapides, FAB¹⁰⁸ (Fast Atom Bombardement), ou par bombardement d'ions lourds LSIMS¹⁰⁸ (Liquid Secondary Ionisation Mass Spectrometry).

L'ion moléculaire est détecté en mode positif, par un adduit à $[M+H]^+$, soit par addition de sodium à $[M+Na]^+$, ou de lithium à $[M+Li]^+$; il existe aussi des ions adduits à deux cations $[M+2Na]^+$ ou $[M+2Li]^+$. Ces techniques ont été utilisées pour les hétérosides comme les withanolides glycosylés. La fragmentation observée en LSIMS correspond à la perte successive des sucres en partant des unités terminales.



fragments dus à la perte successive des sucres dans la dunawithanine G **10**

La fragmentation peut être étudiée aussi à partir d'un ion pseudomoléculaire "père" provenant d'une expérience FAB ou LSIMS; ce type de fragmentation est dénommée spectrométrie de masse par tandem ou MS/MS. Les fragments observés correspondent également à la perte des unités osidiques terminales et à la rupture des oses par des mécanismes à rétention de charge qui permettent de séquencer les chaînes d'oligosaccharides.

Tableau 34. *Expériences de RMN 2D homonucléaires utilisées*

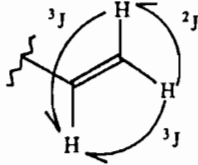
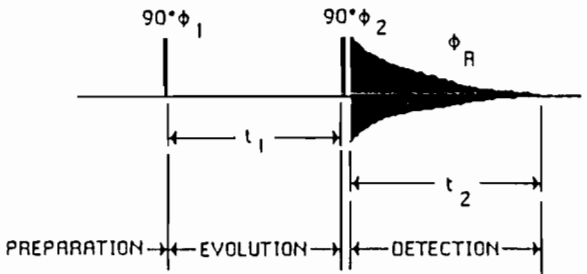
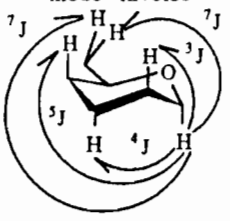
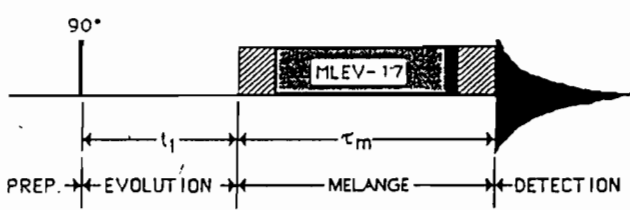
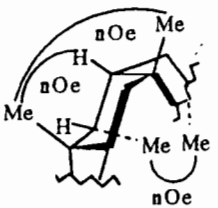
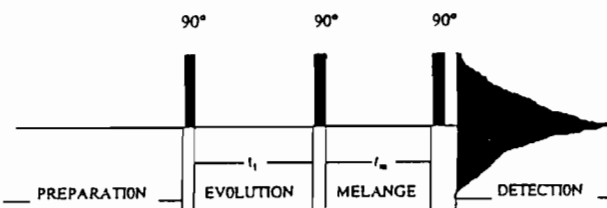
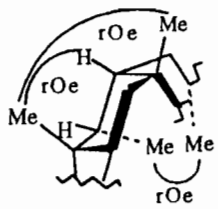
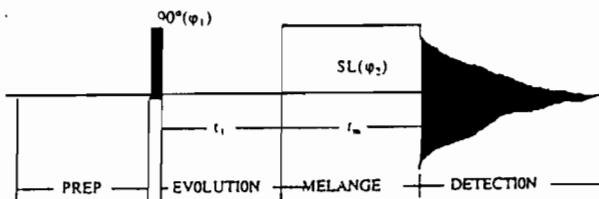
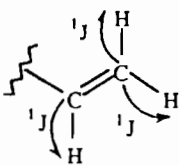
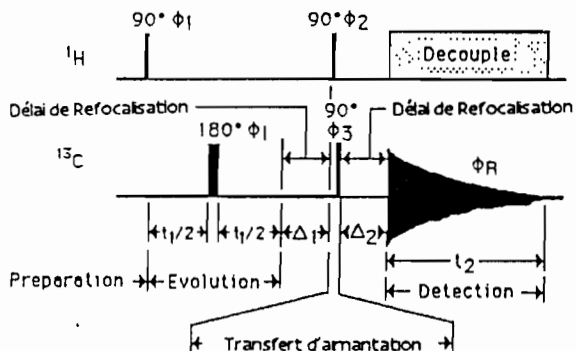
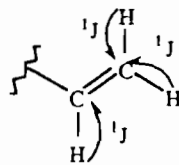
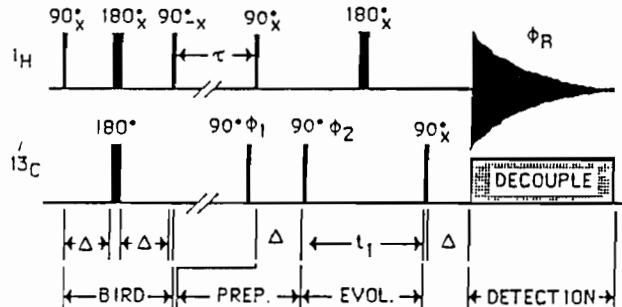
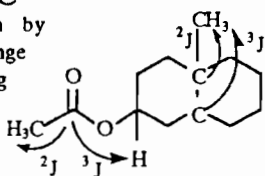
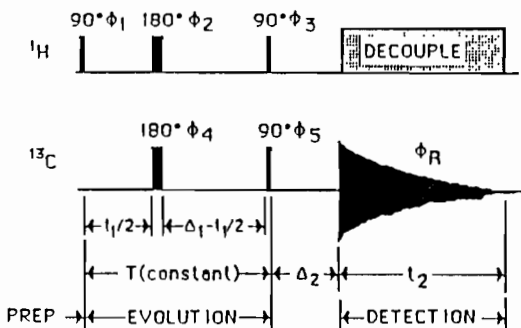
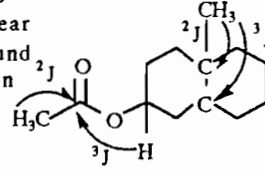
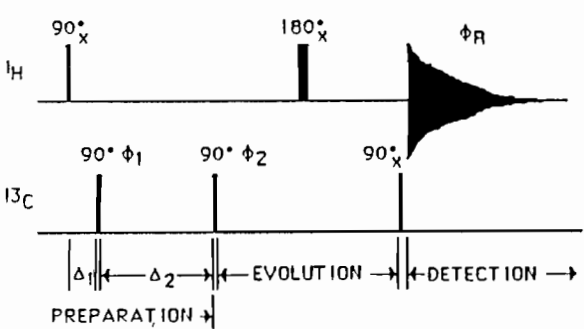
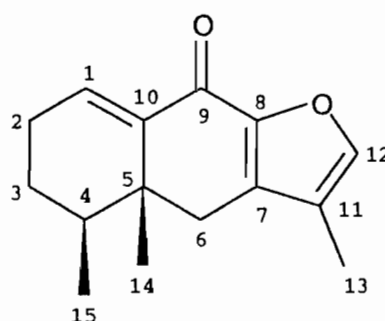
Nom de l'expérience	type de corrélation	séquence d'impulsions
COSY Correlated Spectroscopy	homonucléaire scalaire 	 PREPARATION — EVOLUTION — DETECTION
HOHAHA HOMonuclear HARTmann HAHn	homonucléaire totale mode inverse 	 PREP. — EVOLUTION — MELANGE — DETECTION
NOESY Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	homonucléaire vectorielle 	 PREPARATION — EVOLUTION — MELANGE — DETECTION
ROESY Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy	homonucléaire vectorielle 	 PREP — EVOLUTION — MELANGE — DETECTION

Tableau 35. *Experiences de RMN 2D hétéronucléaires utilisées*

Nom de l'expérience	type de corrélation	séquence d'impulsions
XHCORR XH CORRelated spectroscopy	hétéronucléaire directe 	
HMQC Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Transfer	hétéronucléaire directe mode inverse 	
COLOC COrrrelation by LOng range COupling	hétéronucléaire à longue distance 	
HMBC Heteronuclear Multiple-Bound Correlation	hétéronucléaire à longue distance, mode inverse 	

IV.3.Détermination de structure du composé 1 de *Senecio smithioides*

Le composé **1** se présente sous la forme d'aiguilles cristallines, longues et incolores de $pf = 123-124^\circ$. Son spectre UV présente une large bande d'absorption maximale à λ 302 nm. La présence de cette cétone α,β -insaturée est confirmée sur le spectre IR par une forte bande d'absorption à 1670 cm^{-1} . Ce spectre montre en plus des bandes d'absorption à 3100 cm^{-1} due aux vibrations longitudinales des groupes $\text{C}=\text{C}-\text{H}$, et entre 2970 et 2900 cm^{-1} celles des liaisons de type C-H. L'analyse des diverses expériences de RMN à une et deux dimensions a permis l'établissement définitif de sa structure qui correspond à un sesquiterpène de type furanoérémophilane.



1 furanoérémophil-1(10)-en-9-one

IV.3.1.Analyse du spectre RMN ^1H du composé 1

Le spectre de RMN ^1H (Figure 13) présente dans la région des basses fréquences, des signaux correspondant à deux groupes méthyles, l'un est un singulet à δ 1,00 (3H, H-14) et l'autre un doublet à δ 1,04 (3H, $J_{15,4} = 6,9\text{ Hz}$, H-15), qui correspondent à un méthyle tertiaire (Figure 14 A) et un méthyle secondaire couplé en 3J à un proton méthinique (Figure 14 B). Dans la région de 1,30 à 2,90 ppm, six signaux sont distinguables s'intégrant pour dix protons:

-à δ 1,51 (1H, m , H-3') et δ 1,43 (1H, m , H-3) deux multiplets pour un méthylène (Figure 14 F) et un méthine à δ 1,79 (1H, dqd , $J_{4,3ax} = 10,9\text{ Hz}$, $J_{4,15} = 6,8\text{ Hz}$, $J_{4,3eq} = 4,0\text{ Hz}$, H-4) (Figure 14 B).

-à δ 2,00 un fin doublet (3H, d , $J_{13,12} = 1,1\text{ Hz}$, H-13) correspond à un méthyle pour lequel la duplicité à petite constante de couplage et son déplacement chimique, permettent de le situer comme substituant d'un système vinylique, en présentant un couplage 4J à longue distance de l'ordre d'un Hertz avec un proton du même système (Figure 14 C).

-à δ 2,25 (2H, *m*, H-2) un multiplet de deux protons indique un méthylène de type allylique à plusieurs raies, traduisant un système de spins adjacent (Figure 14 D).

-un système AB (deux doublets) d'un deuxième méthylène allylique à δ 2,45 (1H, *d*, $J_{6,6'} = 16,5$ Hz, H-6) et δ 2,76 (1H, *d*, $J_{6',6} = 16,5$ Hz, H-6'), (Figure 14 E).

Dans la région entre 6,90 à 7,50 ppm, se trouvent deux signaux de deux protons fortement déblindés δ à 6,96 (1H, *t*, $J_{1,2} = 3,8$ Hz, H-1) et 7,38 (1H, *m*, H-12) qui correspondent à des protons non couplés entre eux, appartenant chacun à un système éthylénique. Le premier à δ 6,96 montre une constante de couplage 3J de 3,8 Hz pour un triplet, ce qui décrit un couplage vicinal à un groupe méthylène (Figure 14 D); la valeur $J = 1,1$ Hz pour le doublet du méthyle H-13, indique qu'il couple à H-12 (Figure 14 C).

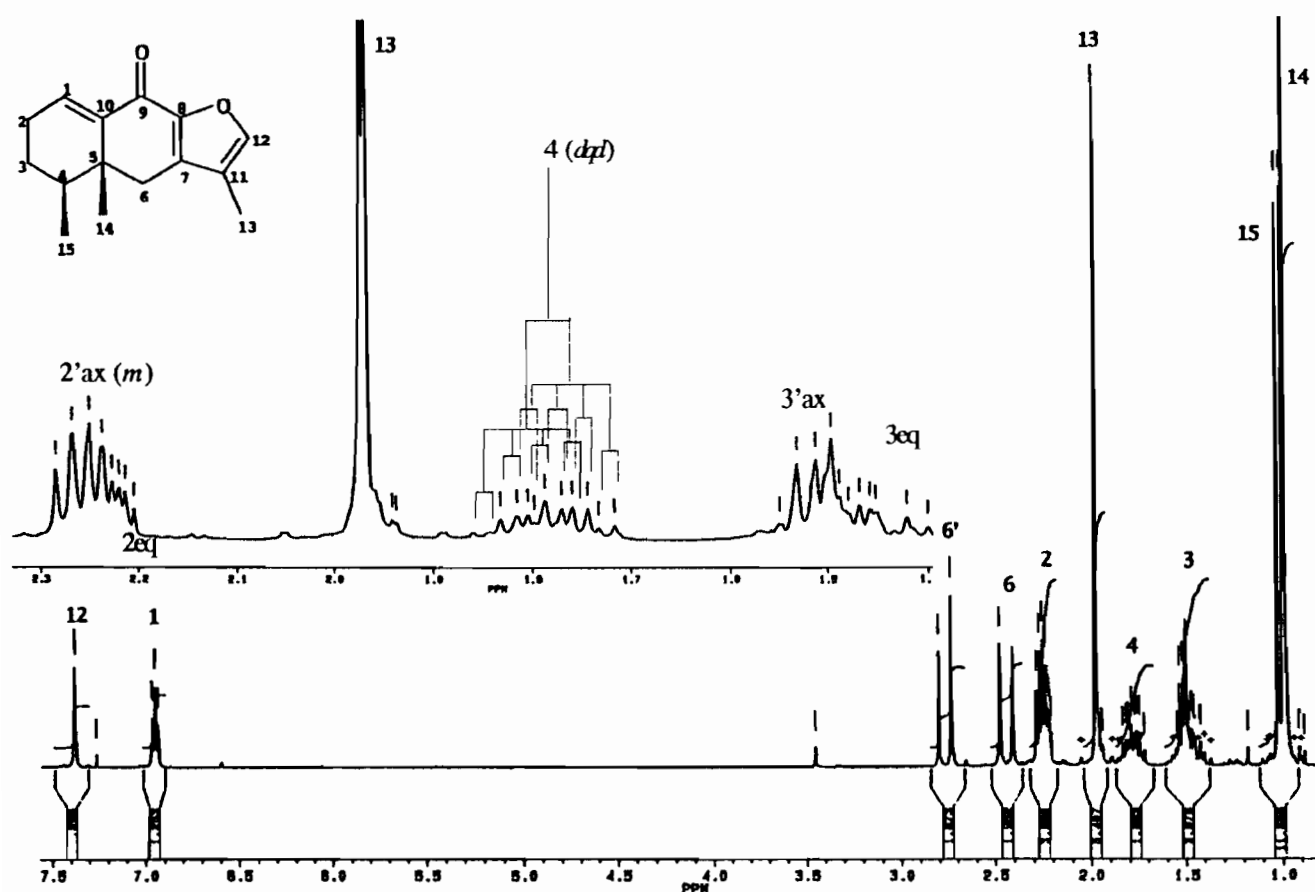


Figure 13. Spectre de RMN ^1H du composé 1 (250 MHz)

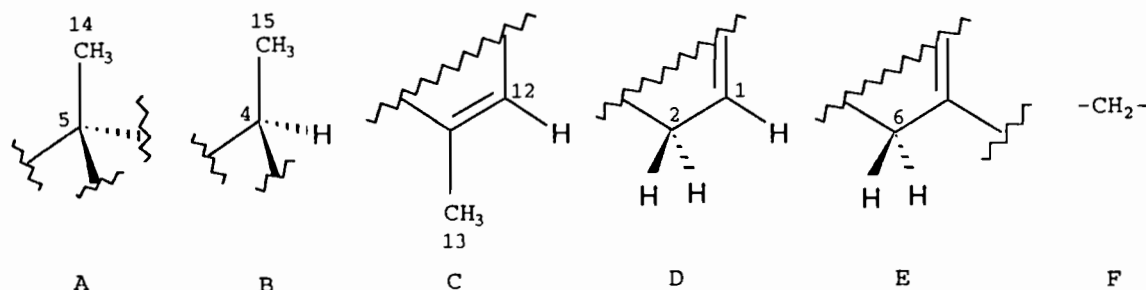
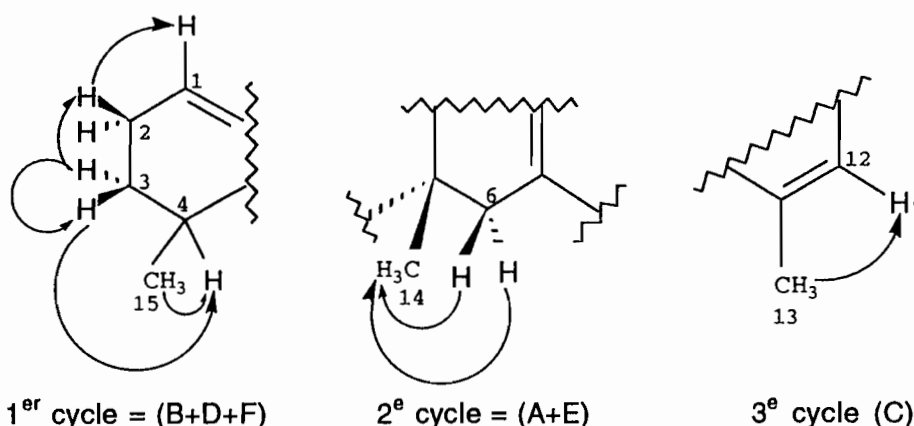


Figure 14. Structures partielles déduites de l'analyse du spectre du proton, composé 1

L'expérience COSY permet d'établir trois systèmes de spins couplés. A partir du proton vinylique H-1 (δ 6,96) et en observant les taches de couplages 3J on identifie les protons H-2, puis H-3, puis H-4 et en fin H-15. Ainsi les éléments D, F et B de la Figure 14 peuvent être assemblés. Le deuxième système de couplage de spins correspond aux deux H-6 et CH₃-14 δ 1,00 qui présentent un couplage très faible 4J matérialisé par deux taches de corrélation faiblement intenses. Ces corrélations permettent d'assembler les morceaux E et A de la Figure 14. Le troisième système couplé de spins comporte la corrélation 4J du H-12 δ 7,38 avec CH₃-13 δ 2,00.



IV.3.2. Analyse du spectre RMN ^{13}C du composé 1

Le spectre découplé de RMN ^{13}C (Figure 15), montre un total de 15 carbones, laissant penser à trois unités isopréniques, ou autrement dit un dérivé sesquiterpénique. L'expérience DEPT a permis de confirmer la présence des trois méthyles à δ 15,6 (*q*, C-15), 20,4 (*q*, C-14) et 7,7 (*q*, C-13), ce dernier étant lié à un carbon sp^2 , trois méthylènes à δ 26,0 (*t*, C-2), 26,2 (*t*, C-3) et 34,1 (*t*, C-6), trois méthines à δ 39,9 (*s*, C-4), 136,5 (*d*, C-1) et 145,1 (*d*, C-12), ces deux derniers étant des carbones éthyléniques vinyliques, et 6 carbones quaternaires à δ 40,3 (*s*, C-5), 121,3 (*s*, C-7) et 137,3 (*s*, C-11), 142,4 (*s*, C-10), 146,9 (*s*, C-8) et 175,8 (*s*, C-9), ce dernier étant un carbonyle. Le spectre de

masse d'impact électronique de basse résolution donne l'ion moléculaire à m/z 230 qui peut donc être analysé pour $C_{15}H_{18}O_2$.

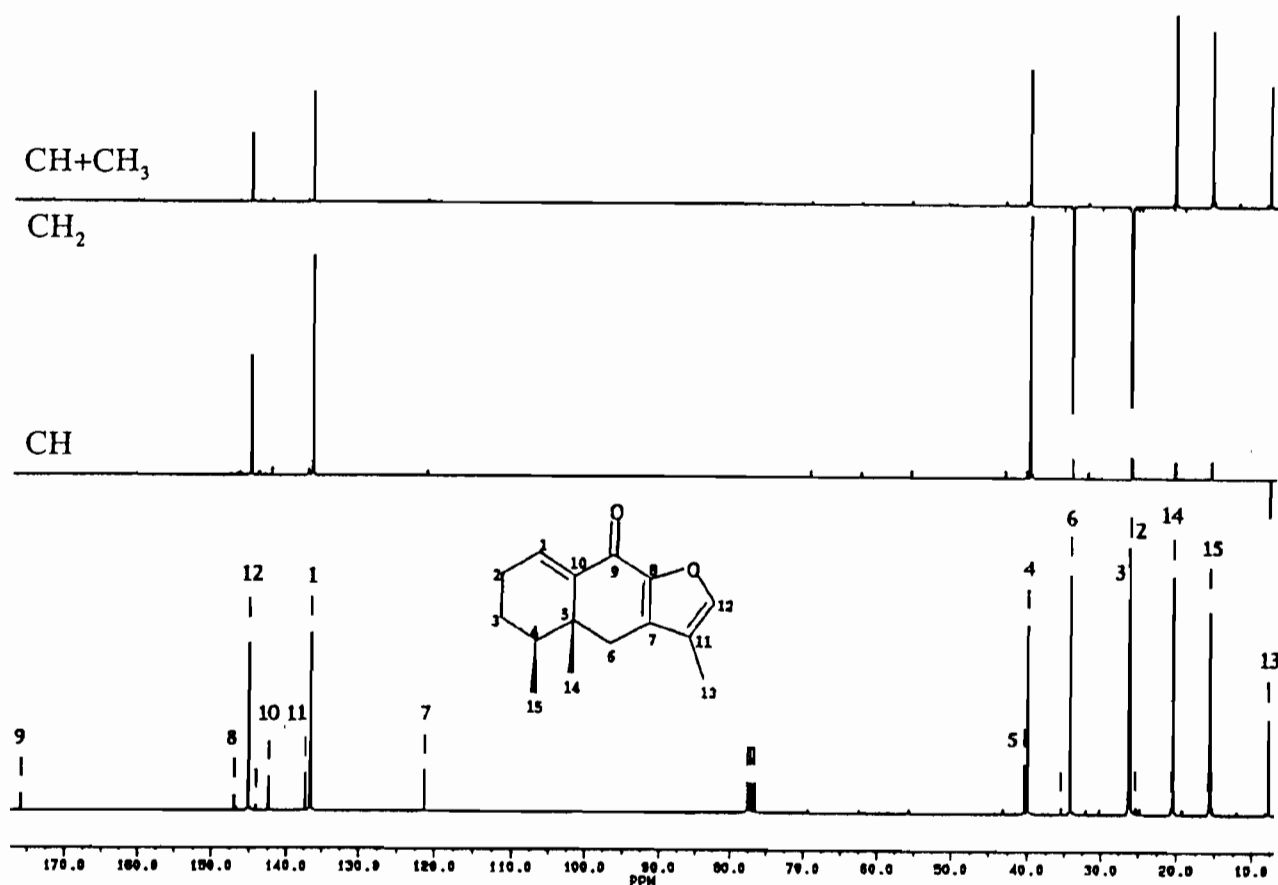


Figure 15. Spectres de RMN ^{13}C et DEPT 90° et 135° du composé 1 (62,9 MHz)

Ainsi le composé 1, renferme 7 insaturations. Parmi les six carbones quaternaires cinq sont d'hybridation sp^2 dont un appartient à un carbonyle, ce qui laisse quatre carbones quaternaires éthyléniques sp^2 . La présence des deux protons éthyléniques isolés implique deux doubles liaisons à deux carbones quaternaires sp^2 chacune. Les deux quaternaires restant ne peuvent que former une troisième double liaison tétrasubstituée.

D'après le nombre d'insaturations, quatre correspondent aux trois systèmes éthyléniques déjà décrits et au carbonyle, les trois restantes correspondent à une structure à 3 cycles fusionnés dont le premier contiendrait les éléments (B+D+F), le second les éléments (A+E) et le dernier l'élément (C). Le squelette cyclohydrocarboné final du composé 1 ne peut venir que d'après une analyse des corrélations hétéronucléaires. L'établissement de corrélations hétéronucléaires directes et à longue

distance a été accompli grâce à des expériences XHCORR ($^1J_{CH}$) et COLOC ($^2J_{CH}$, $^3J_{CH}$). Les corrélations les plus importantes observées dans le spectre COLOC sont reportées dans la Figure 16 et la Figure 17. Les corrélations qui permettent de relier les éléments A, B et C obtenus de l'analyse des spectres proton sont H-6/C-4, H-6/C-5, H-6/C-10, H-15/C-5, H-2/C-10, H-4/C-14, H-4/C-6 et H-14/C-6. Le carbonyle C-9 montre une corrélation avec H-1, l'ensemble de ces corrélations permet de fusionner les deux premiers cycles I et II entre eux pour donner un squelette cyclohexène - cyclohexénone (Figure 18). Les corrélations relevées avec les carbones quaternaires éthyléniques sp^2 entre 120 et 150 ppm sont celles qui permettent de fusionner le troisième cycle III au cycle II (Figure 18). Ainsi on observe les corrélations de: H-6/C-11, H-6/C-7, H-6/C-8, H-13/C-11, H-13/C-7, H-12/C-8.

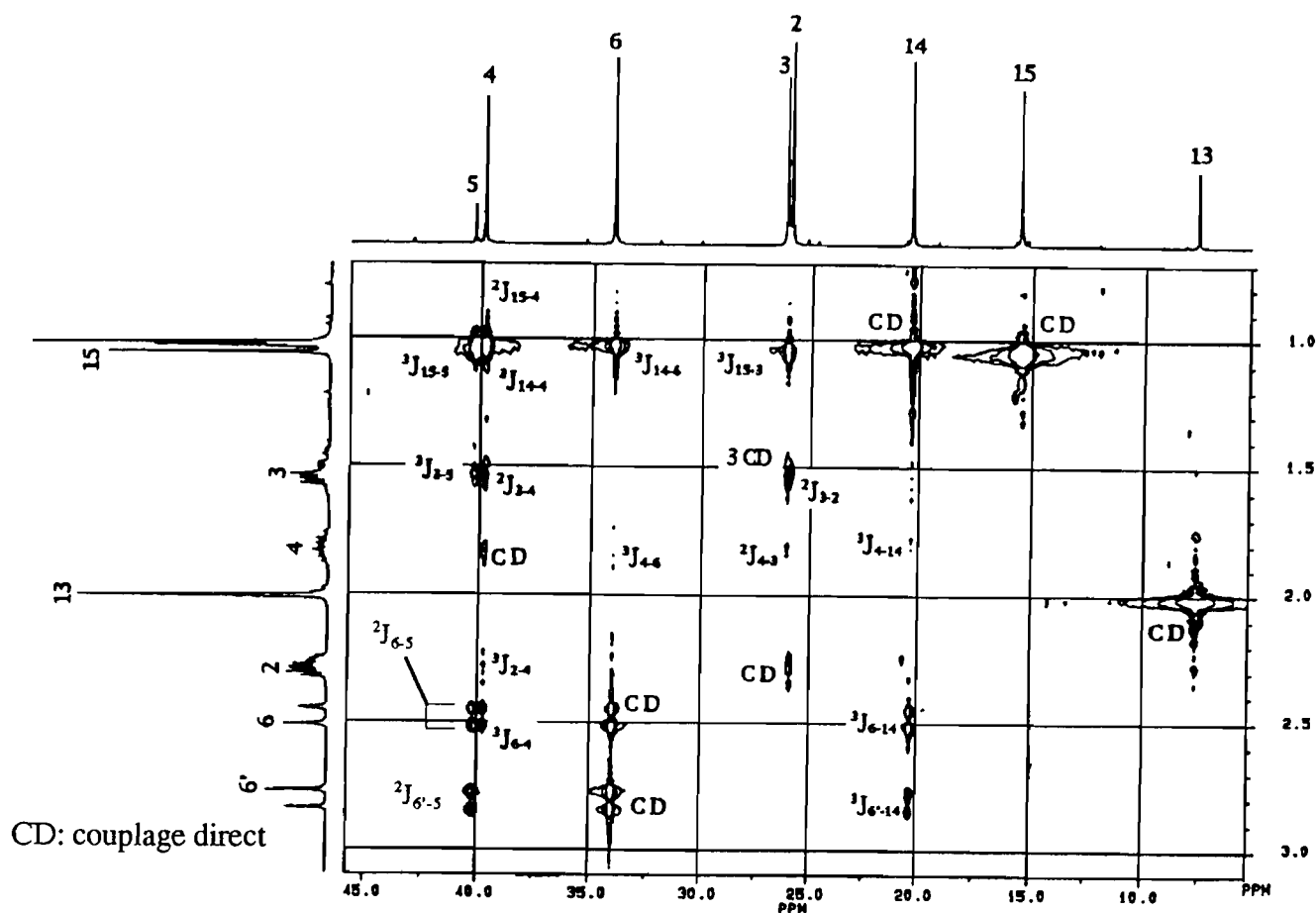


Figure 16. Spectre COLOC (agrandissement) du composé 1, corrélations pour les cycles I et II

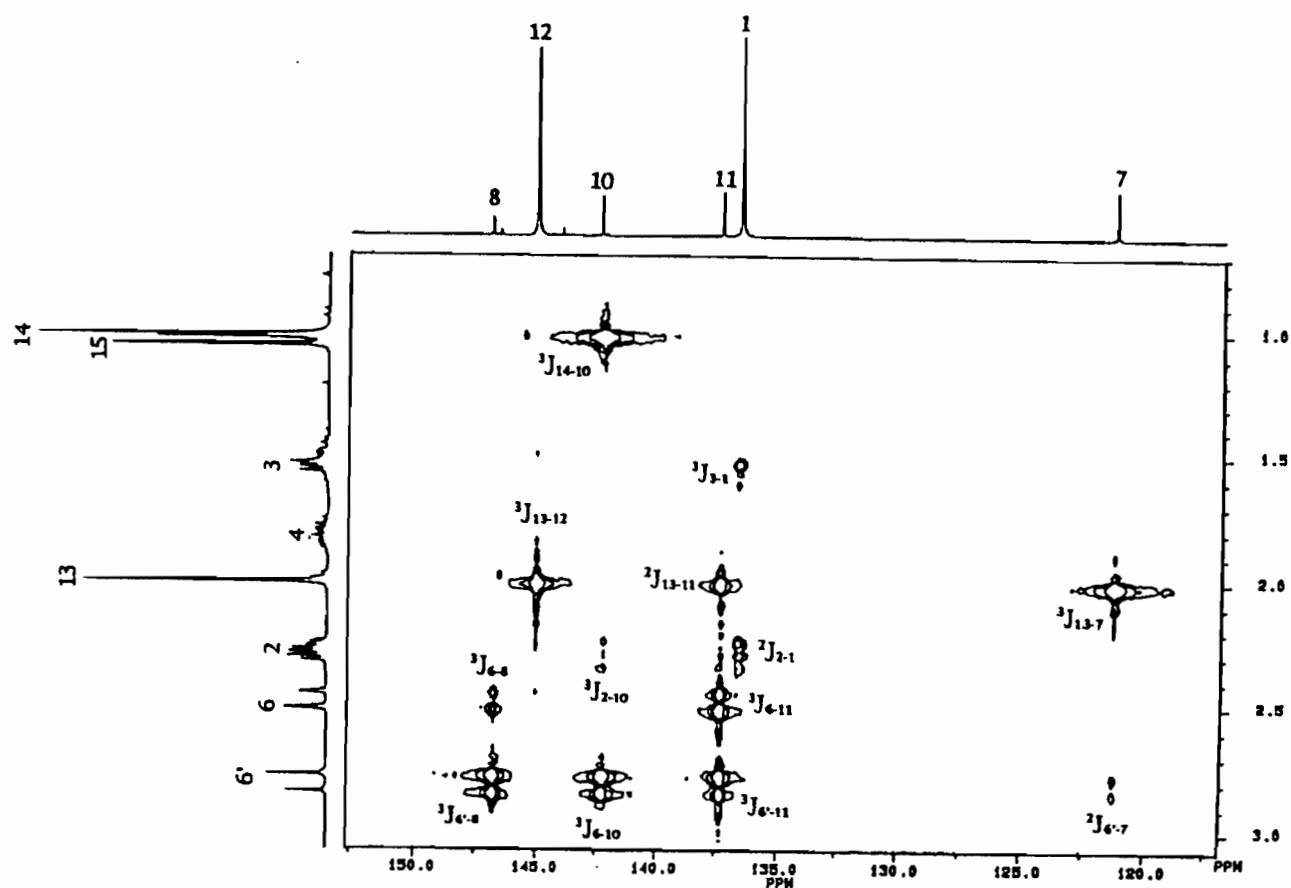


Figure 17. Spectre COLOC (agrandissement) du composé 1, corrélations des cycles I, II et III

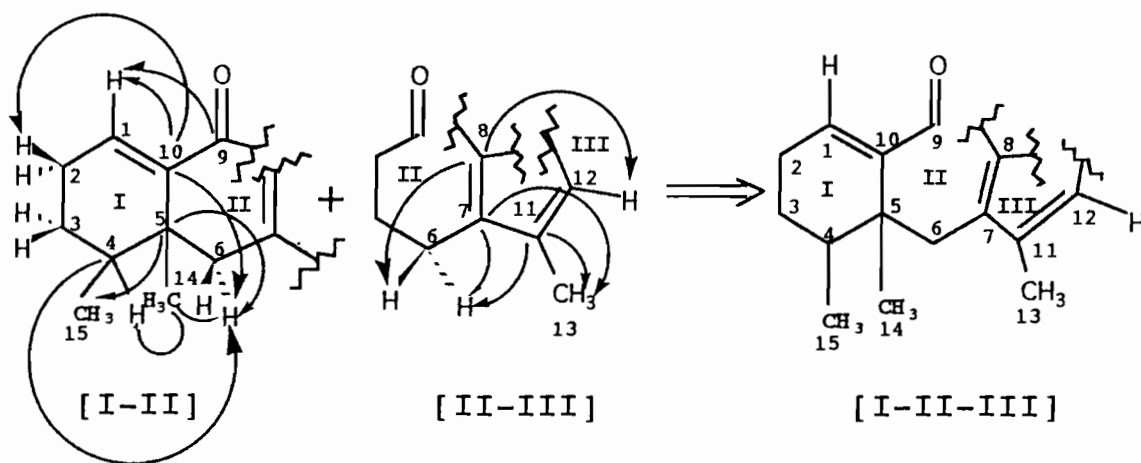
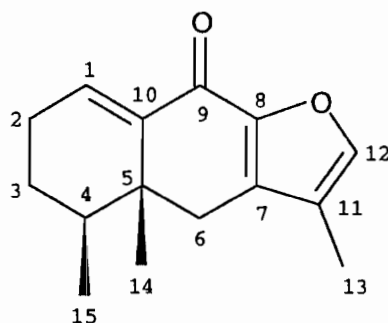
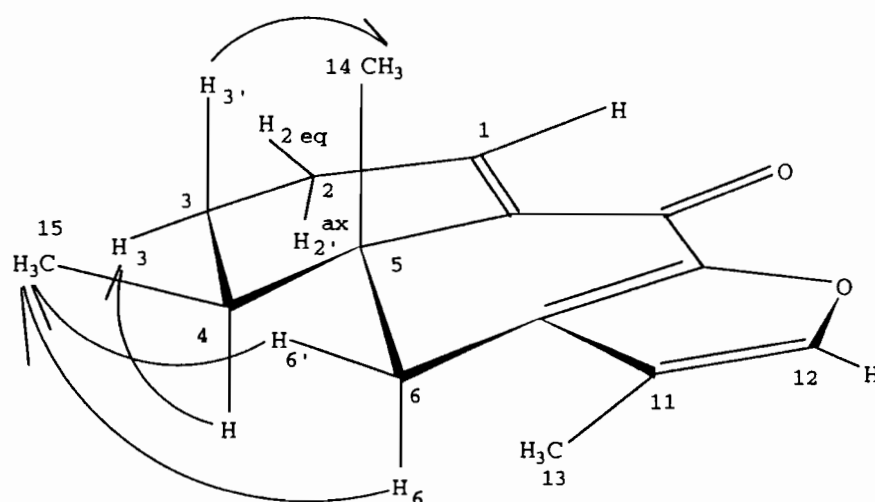


Figure 18

D'après la formule moléculaire $C_{15}H_{18}O_2$, il reste un atome d'oxygène à placer dans la structure. L'oxygène peut former une lactone entre C-9 et C-8 ou bien, être placé entre C-8 et C-12 pour fournir

une cyclo- α,β -hexènone fusionnée à un furane. L'oxygène du furane explique les déplacements chimiques très proches des C-12 et C-8 (δ 145,1 et δ 146,9). L'obtention d'un spectre de ^{13}C couplé montre un doublet de quadruplets centré à δ 145,1 pour C-12 séparés par une constante de couplage $^1J_{\text{CH}}$ de 200 Hz, caractéristique d'un carbone oxygéné d'un furane.

Une expérience NOESY a été réalisée dans l'espoir de trouver des corrélations vectorielles afin de déterminer les configurations α ou β des groupes méthyliques C-14 et C-15. Les effets NOE observés sont figurés ci-dessous:

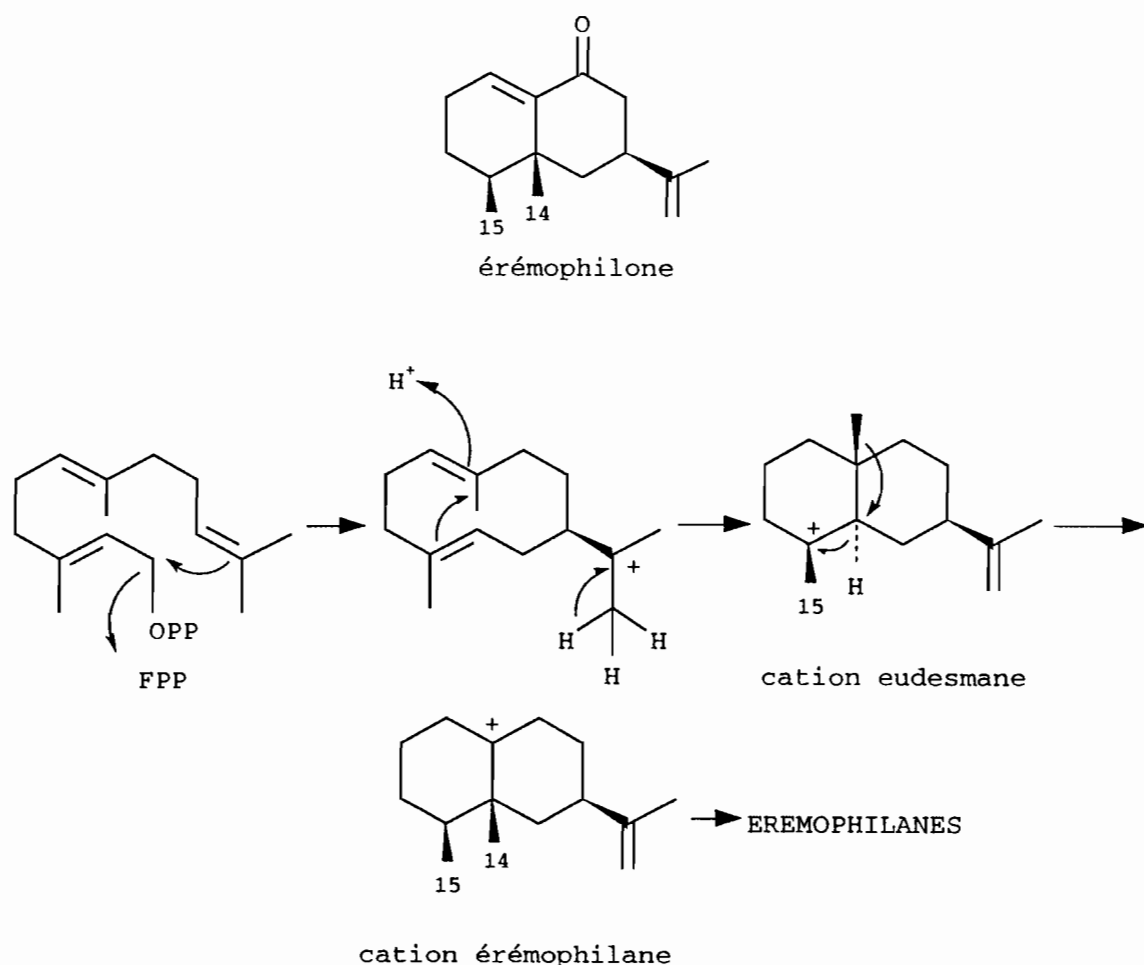


1 furanoérémophil-1(10)-en-9-one

Le déplacement chimique du C-15 vers 16 ppm et les constantes de couplage $J_{4,3}$ de 10,9 et 4,0 Hz indiquent que le CH_3 -15 est équatorial et le H-4 axial. Un effet NOE intense et un autre moins intense sont observés entre H-6' et H-15 (plus intense) et entre H-6 et H-15 (moins intense) qui respectivement permettent d'identifier à H-6' en position équatoriale et H-6 en position axiale. Un effet NOE entre H-3' (axial) et le CH_3 -14 permet de placer H-14 en position β . Enfin, un effet NOE

entre H-3 (équatorial) et H-4 permet d'observer encore la position axiale pour H-4. La structure finale du composé 1 reste ainsi définie comme le sesquiterpène furanoérémophil-1(10)-en-9-one.

Les stéréochimies relative et absolue ont été déterminées pour l'érémophilone en déterminant une position β pour les CH₃-15 (équatoriale), CH₃-14 et le groupe isopropyle.¹⁰⁹ L'érémophilone du point de vue biosynthétique, appartient au groupe des érémophilanes, obtenus par cyclisation du 2E,6E-farnesyl pyrophosphate (FPP). Cette biosynthèse inclut un intermédiaire eudesmane cationique qui présente déjà les deux méthyles 14 et 15 en position β .¹⁰⁹ Ces arguments appuient l'attribution de configuration pour le composé 1 obtenue d'après l'analyse de RMN.



La structure proposée d'après l'analyse des données de RMN a été corroborée par l'étude du spectre de masse sous impact électronique à basse résolution qui donne un pic moléculaire à m/z 230 (100%,

$C_{15}H_{18}O_2$). Le premier fragment correspond à un ion à m/z 215 provenant de la perte d'un méthyle. La perte successive de trois méthylènes engendre les ions à m/z 201 ($215 - CH_2$), m/z 187 ($201 - CH_2$) et m/z 173 ($187 - CH_2$). Le fragment à m/z 145 obéit à la perte de $CHCH_3$ à partir de l'ion m/z 173.

La furanoérémophil-1(10)-en-9-one¹¹⁰ (**1**) est aussi connue sous le nom de 9-oxoeuryopsine et isolée auparavant des espèces *Euryops hebecarpus*¹¹⁰ et *S. serratifolius*.¹¹¹ Ce travail a permis de connaître les caractéristiques spectrales de RMN ^{13}C de ce composé. Le Tableau 36 renferme les données de RMN 1H et ^{13}C du composé **1**.

Tableau 36. Données de RMN du composé **1** dans $CDCl_3$, δ^1H à 250 MHz et $\delta^{13}C$ à 62,9 MHz

Atome	1H	^{13}C
1	6,96 <i>t</i> (3,8 Hz)	136,5
2'ax	2,25 <i>m</i>	26,0
2eq	2,23 <i>m</i>	
3'	1,51 <i>m</i>	26,2
3	1,43 <i>m</i>	
4	1,79 <i>dqd</i> (10,9, 6,8, 4,0 Hz)	39,9
5		40,3
6	2,45 <i>d</i> (16,5 Hz) 2,76 <i>d</i> (16,5 Hz)	34,1
7		121,3
8		146,9
9		175,8
10		142,4
11		137,3
12	7,38 <i>m</i>	145,1
13	2,00 <i>d</i> (1,1 Hz)	7,7
14	1,00 <i>s</i>	20,4
15	1,04 <i>d</i> (6,9 Hz)	15,6

IV.3.Détermination de structure des composés d'*Amburana cearensis*

IV.3.1.Composé 2

Le composé **2** cristallise sous la forme de cristaux orthorhombiques incolores de point de fusion 68 - 69 °C. Le spectre IR montre les bandes d'absorption d'un noyau lactonique à 1710 et 1440 cm^{-1} , et l'existence d'un noyau aromatique (1609 cm^{-1}). Son absorption maximale en UV apparaît à λ 260 nm pour un chromophore de type lactonique α,β -insaturé. Sa structure a été identifiée comme étant la coumarine.

IV.3.1.1.Analyse du spectre RMN ^1H du composé 2

Le spectre de RMN ^1H (Figure 19) présente un système de spins couplés à deux protons vicinaux et appartenant à un système vinylique δ 6,40 (1H, d , $J_{4,3} = 9,6$ Hz, H-4) et δ 7,69 (1H, d , $J_{3,4} = 9,6$ Hz, H-3), le fort déblindage indique qu'il se situe en α d'un carbonyle. La configuration *cis* a été adoptée d'après la valeur de sa constante de couplage de 9,6 Hz. Entre 7,2 et 7,56 ppm, apparaît deux massifs couplés s'intégrant pour deux protons chacun, caractéristiques de protons aromatiques et ce qui sous-entend un cycle benzénique disubstitué.

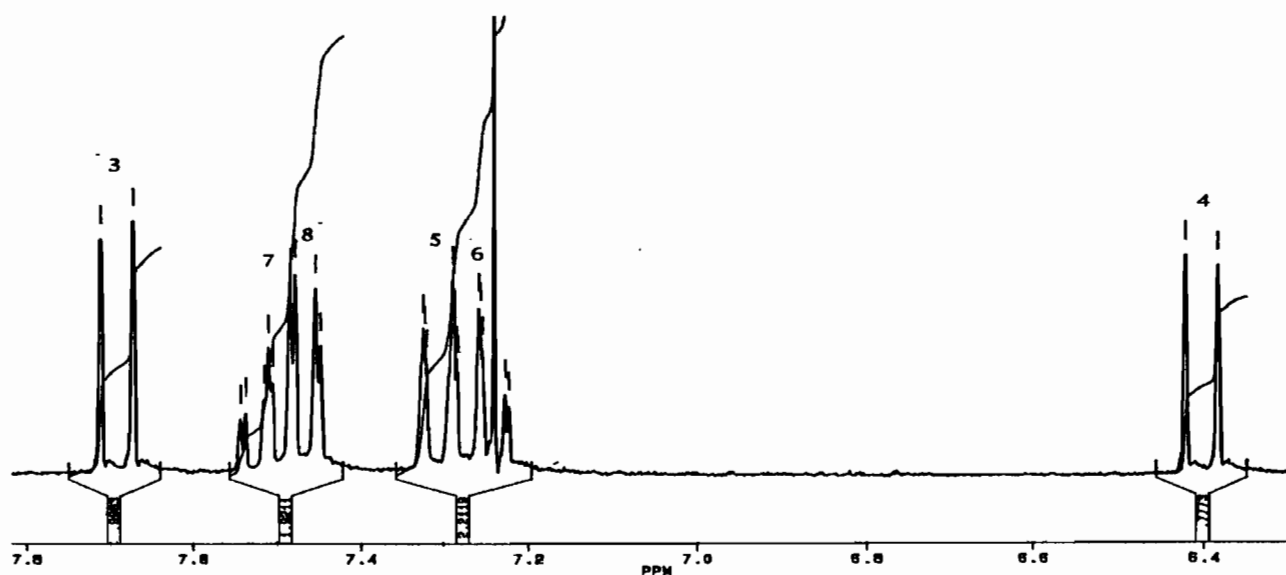
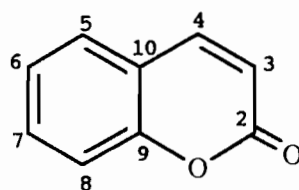


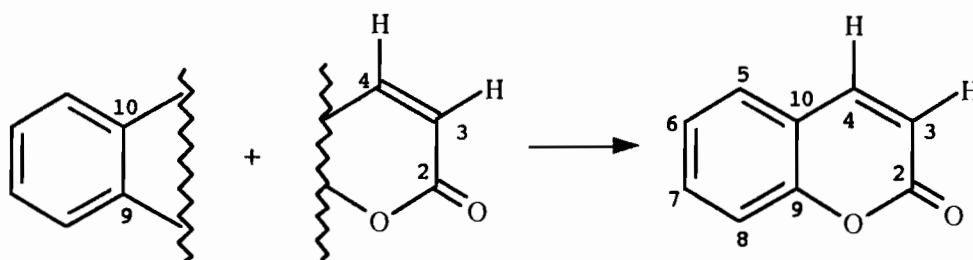
Figure 19. Spectre de RMN ^1H du composé 2 (250 MHz)

**2 coumarine**

IV.3.1.2. Analyse du spectre RMN ^{13}C du composé 2

Le spectre RMN ^{13}C (Figure 20) a été attribué d'après l'analyse des expériences hétéronucléaires DEPT. On constate l'existence de neuf signaux, dont trois quaternaires δ 160,7 (*s*, C-2), δ 154,0 (*s*, C-9) et δ 118,8 (*s*, C-10) et six CH, δ 143,4 (*d*, C-3), δ 131,8 (*d*, C-7), δ 127,8 (*d*, C-8), δ 124,4 (*d*, C-6), δ 116,9 (*d*, C-5) et δ 116,7 (*d*, C-4). En considérant l'existence d'un groupe carbonyle, δ 160,7 (*s*, C-2) et celle d'un carbone oxygéné δ 154,0 (*s*, C-9), on peut proposer une formule moléculaire en $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$.

Le spectre de masse d'impact électronique de basse résolution montre le pic moléculaire à m/z 146, ce qui confirme la formule brute proposée. Le système éthylénique formé du C-3 et C-4, est adjacent au groupement lactonique α,β -insaturé entraînant un déplacement chimique du C-3 très déblindé (δ 143,4) et un blindage du carbonyle C-2. Le carbone benzénique C-9 à δ 154,0 porteur d'oxygène possède un fort déblindage de son déplacement chimique en comparaison à celui du C-10 à δ 118,8, deuxième carbone benzénique en jonction de cycle.



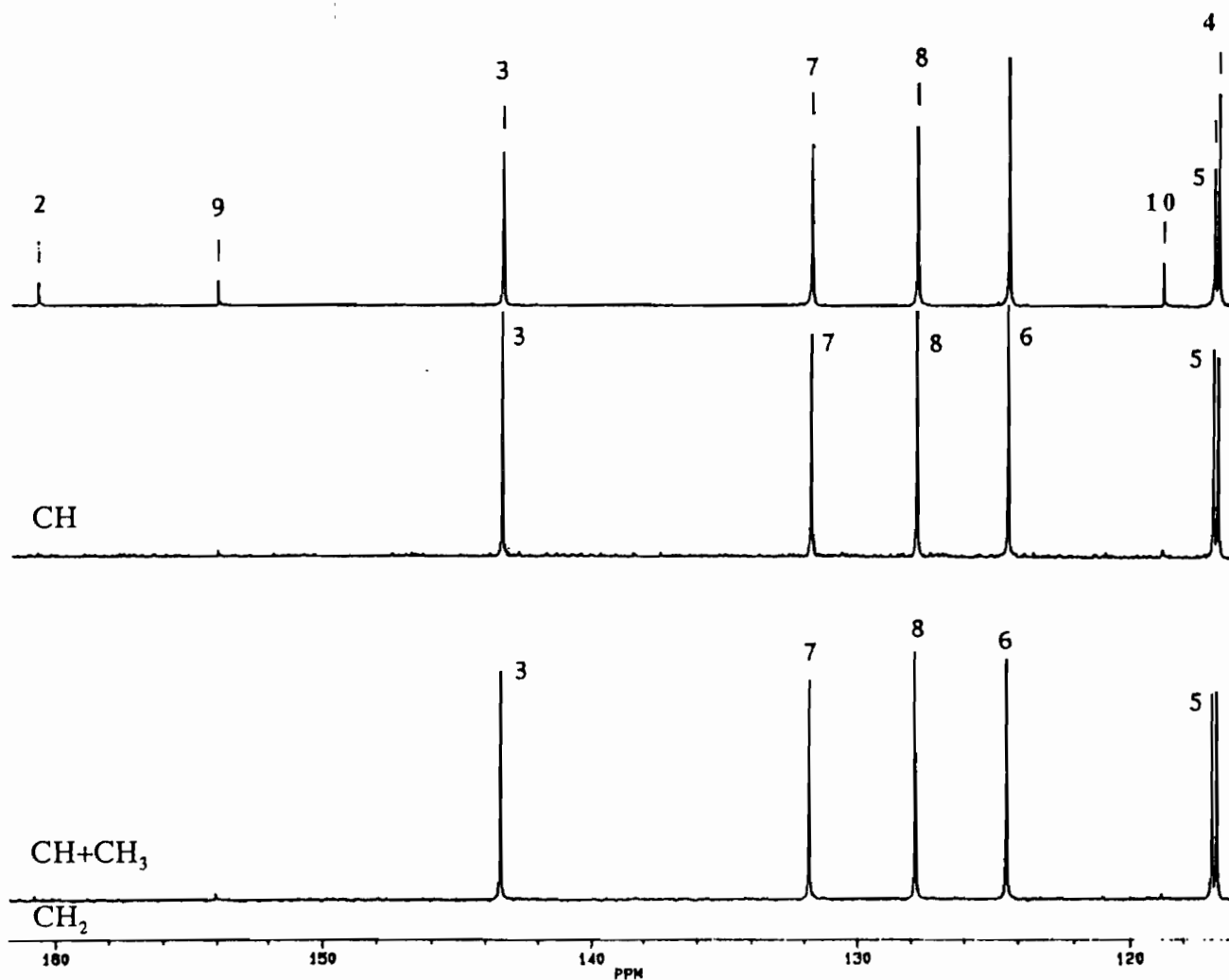


Figure 20. Spectres de RMN ^{13}C , DEPT 90° et 135° du composé 2 (62,9 MHz)

Toute l'analyse a conduit à l'établissement de l'identité structurale du composé 2 comme la coumarine¹¹² ou 2H-1-benzopyran-2-one.

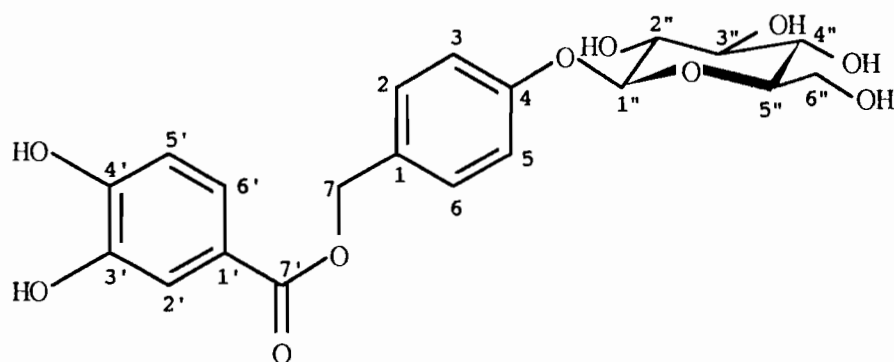
L'attribution finale des protons aromatiques (Tableau 37), a été accomplie à l'aide des spectres de RMN à deux dimensions: XHCORR et COLOC.

Tableau 37. *Données de RMN du composé 2 dans CDCl₃, à 250 MHz et 62,9 MHz*

Atome	¹ H	¹³ C
2		160,7
3	7,69 <i>d</i> (9,6 Hz)	143,4
4	6,40 <i>d</i> (9,6 Hz)	116,7
5	7,31 <i>dm</i> (8,7 Hz)	116,9
6	7,26 <i>tm</i> (8,7 Hz)	124,4
7	7,69 <i>td</i> (8,7, 1,6 Hz)	131,8
8	7,46 <i>dt</i> (8,7, 1,6 Hz)	127,8
9		154,0
10		118,8

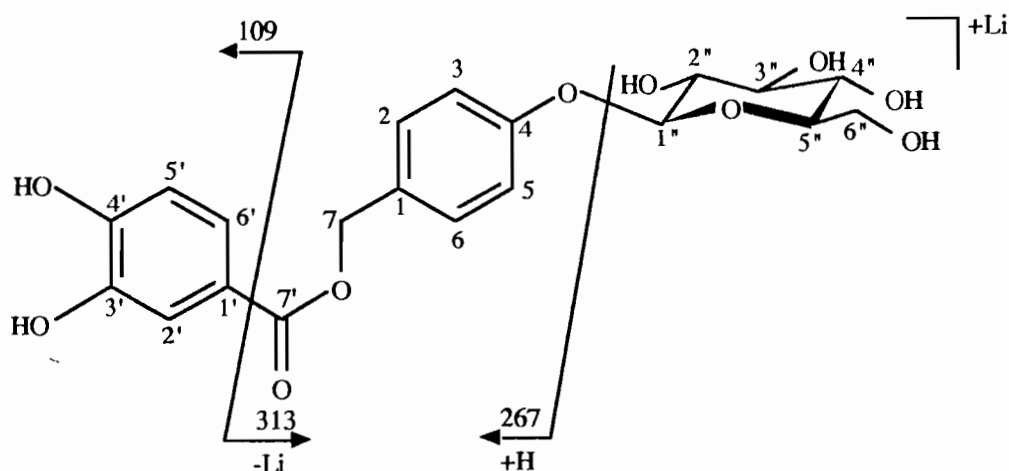
IV.3.2.Composé 3

L'extrait à l'acétate d'éthyle renferme deux produits de polarité moyenne dont l'analyse structurale a donné deux composés nouveaux. Le premier dénommé amburoside A a été isolé sous la forme de cristaux de couleur jaune pâle de point de fusion 195-197 °C. Sa solubilité dans le méthanol pur ou dans des mélanges dichlorométhane-méthanol, indique une certaine polarité relevant d'une structure polyhydroxylée comme par exemple un glycoside. Ce composé 3 est un dérivé phénolique glucosylé.



3 amburoside A

Le spectre de masse FAB en mode positif du composé 3 montre un pic à 429 $[M+Li]^+$ analysé pour $C_{20}H_{22}O_{10}Li$. Le pic de base à m/z 267 correspond à la perte d'un hexose $[M+Li-hexose+H]^+$.



Le spectre IR montre des bandes d'absorption d'un ester aromatique (1680 et 1240 cm^{-1}) et l'existence d'un noyau aromatique (bandes à 1609 et 1510 cm^{-1}) en plus de fonctions hydroxyyles (3340 cm^{-1}). L'absorption maximale en UV apparaît comme une bande élargie à $\lambda\ 220\text{ nm}$

IV.3.2.1. Analyse des spectres de RMN ^1H et COSY

Le spectre RMN ^1H (Figure 21) montre des signaux caractéristiques de deux systèmes aromatiques entre $\delta\ 7,5$ et $6,5$ et ceux d'un système osidique avec un proton anomère à $\delta\ 4,92$ (1H, d , $J_{1',2'} = 7,4\text{ Hz}$, H-1''); cette valeur de J permet d'adopter la configuration transdiaxiale des proton H-1'' et H-2'' pour le sucre. Le reste des protons osidiques résonnent entre $\delta\ 3,3$ et $4,0\text{ ppm}$ dont un doublet de raies élargies et un doublet de doublets qui correspondent à un groupe oxyméthylène d'un sucre à $\delta\ 3,90$ (1H, dl , $J_{6''a,6''b} = 11,7\text{ Hz}$, H-6''a) et à $\delta\ 3,70$ (1H, dd , $J_{6''b,6''a} = 11,7\text{ Hz}$, $J_{6''b,5''} = 4,3\text{ Hz}$, H-6''b). Ces derniers confirment la présence d'un hexose.

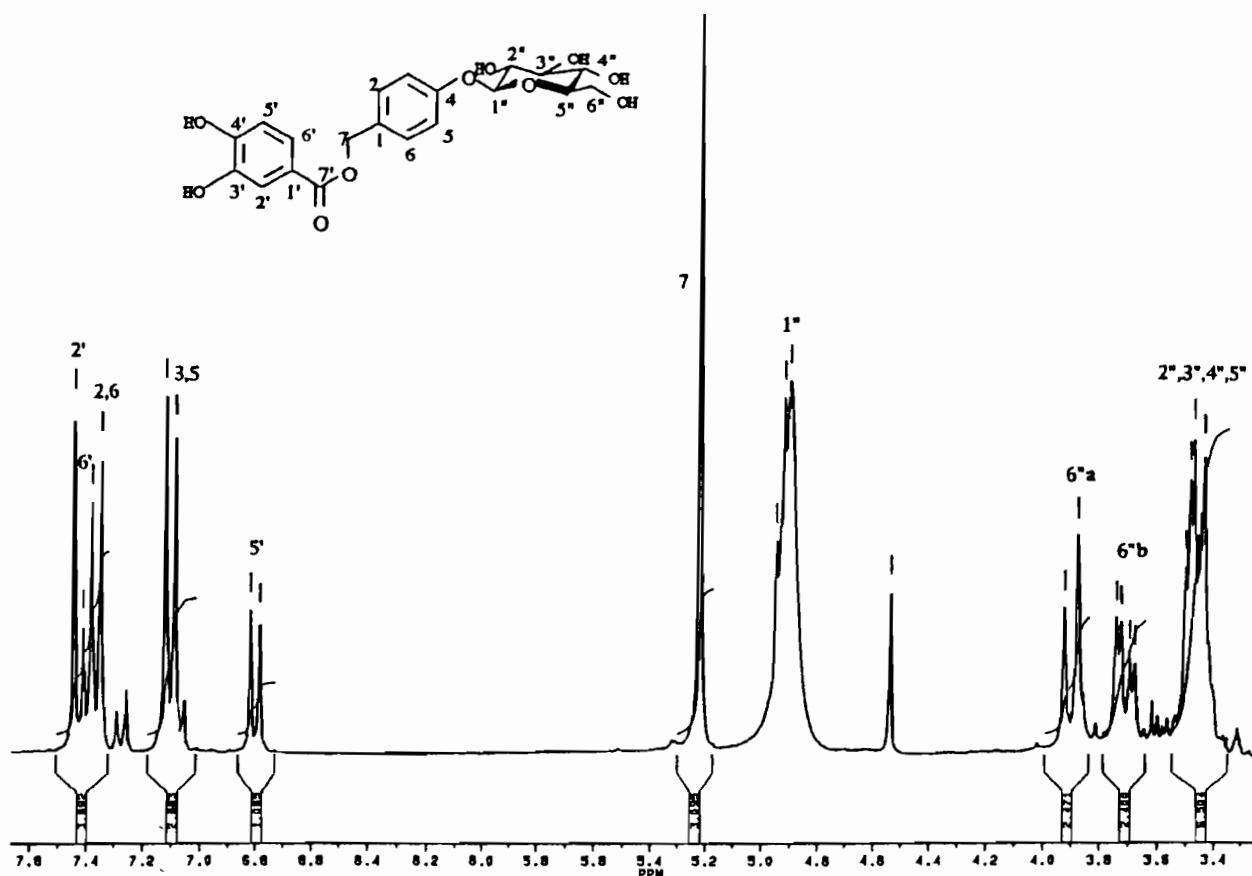


Figure 21. Spectre de RMN ^1H du composé 3 (250 MHz)

Au milieu du spectre, un singlet intégré pour deux protons à δ 5,22 (s, H-7) signale un groupe oxyméthylène isolé non couplé (Figure 23 A) très déblindé à cause de sa proximité d'un système aromatique.

Les agrandissements COSY (Figure 22 et Figure 24), laissent voir clairement l'existence de quatre systèmes de spins: les deux premiers localisés dans la région aromatique, le troisième correspond au système osidique et le quatrième formé du singlet des protons équivalents de l'oxyméthylène (H-7) qui ne présente pas de corrélations homonucléaires vicinales.

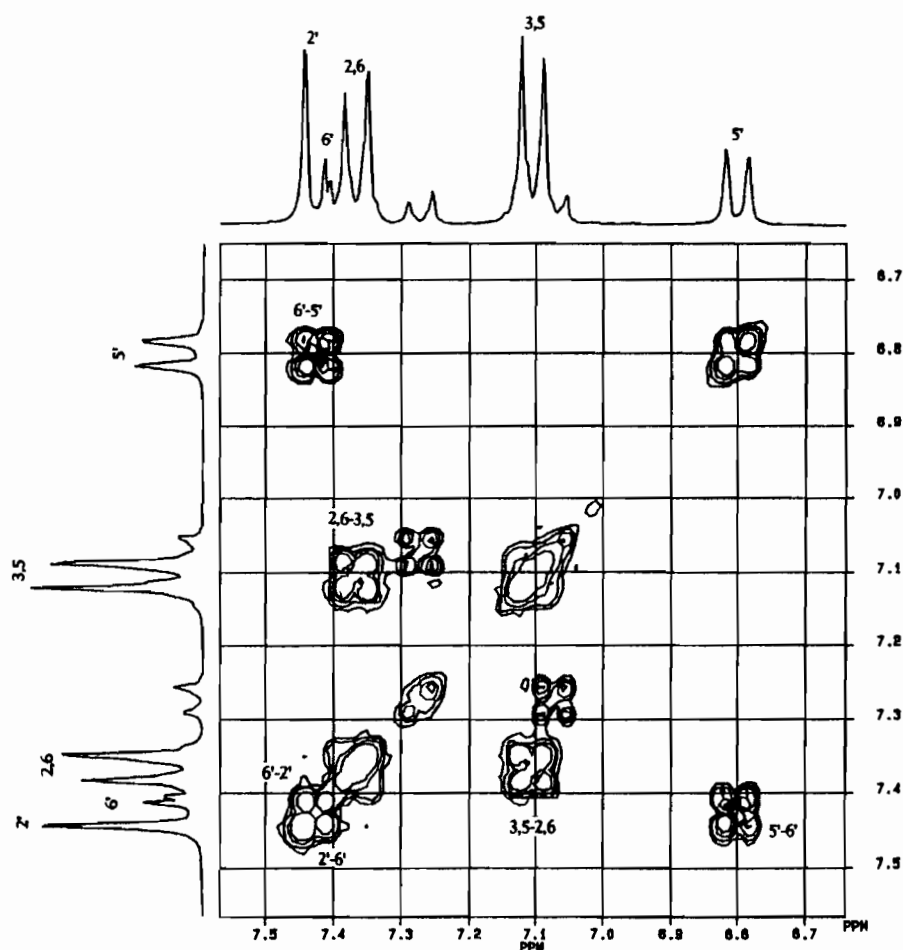


Figure 22. Agrandissement COSY du composé 3, zone des protons aromatiques (250 MHz)

L'égalité des valeurs des constantes de couplage pour les deux doublets à δ 7,37 (2H, d , $J_{2,3} = J_{6,5} = 8,4$ Hz, H-2 et H-6) et δ 7,11 (2H, d , $J_{3,2} = J_{5,6} = 8,4$ Hz, H-3 et H-5), et la valeur de l'intégrale (2H)

pour chaque doublet permet de considérer un élément de symétrie et ainsi de supposer la présence d'un noyau aromatique *para*-disubstitué avec son système AA'XX' (Figure 23 B).

Sur l'agrandissement COSY (Figure 22), on visualise le couplage 3J entre les protons magnétiquement équivalents H-2/H-6 et H-3/H-5 (système AA'XX') de ce premier noyau *para*-disubstitué

Le troisième doublet dans la région aromatique à δ 6,80 (1H, *d*, $J_{5',6'} = 8,5$ Hz, H-5'), s'intègre pour un proton et présente une constante légèrement plus grande, il appartiendrait donc au deuxième système aromatique (Figure 23 C). L'agrandissement COSY de la Figure 22 confirme également que H-5' est couplé 3J au H-6' à δ 7,41 (1H, *dd*, $J_{6',5'} = 8,5$ Hz, $J_{6',2'} = 2,0$ Hz); ce dernier présente une seconde tache de corrélation pratiquement située sur la diagonale avec H-2' à δ 7,42 (1H, *d*, $J_{2',6'} = 2,0$ Hz, système ABX, Figure 23 C).

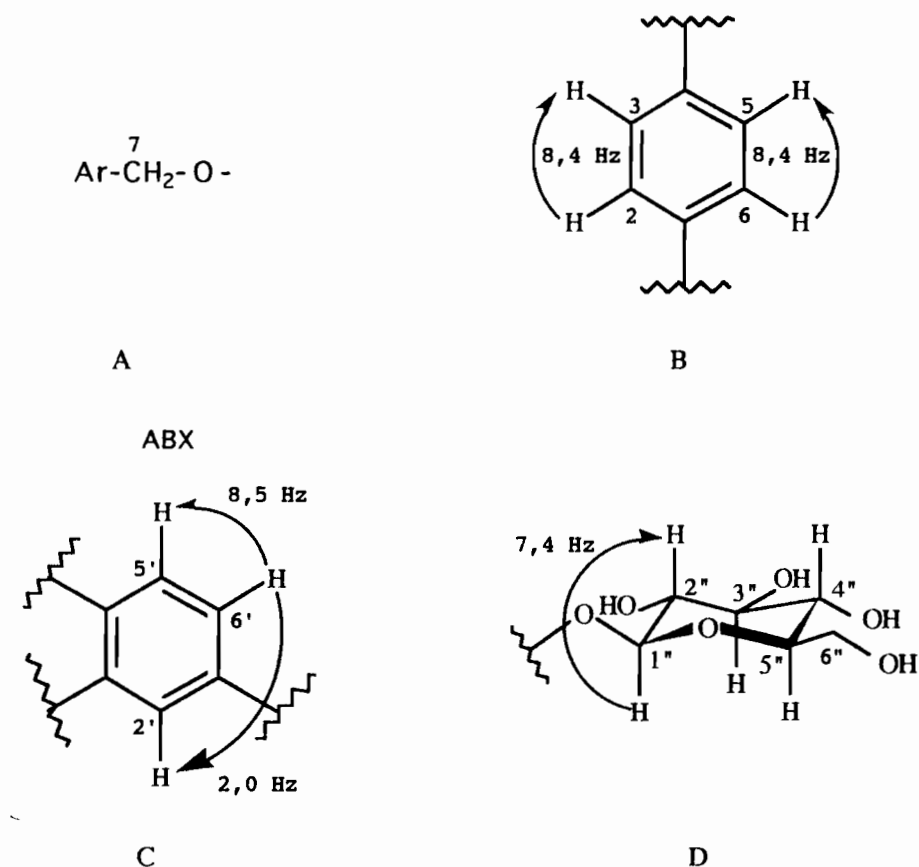


Figure 23

Pour la partie osidique (Figure 23 D), la carte COSY (Figure 24), montre une tache de corrélation entre l'anomère du sucre avec le massif des protons osidiques entre δ 3,6 et 3,3. Ce massif présente des corrélations avec le système ABX des protons du H-6'' de l'hexose. Ce spectre ne permet pas d'identifier la nature de l'unité osidique.

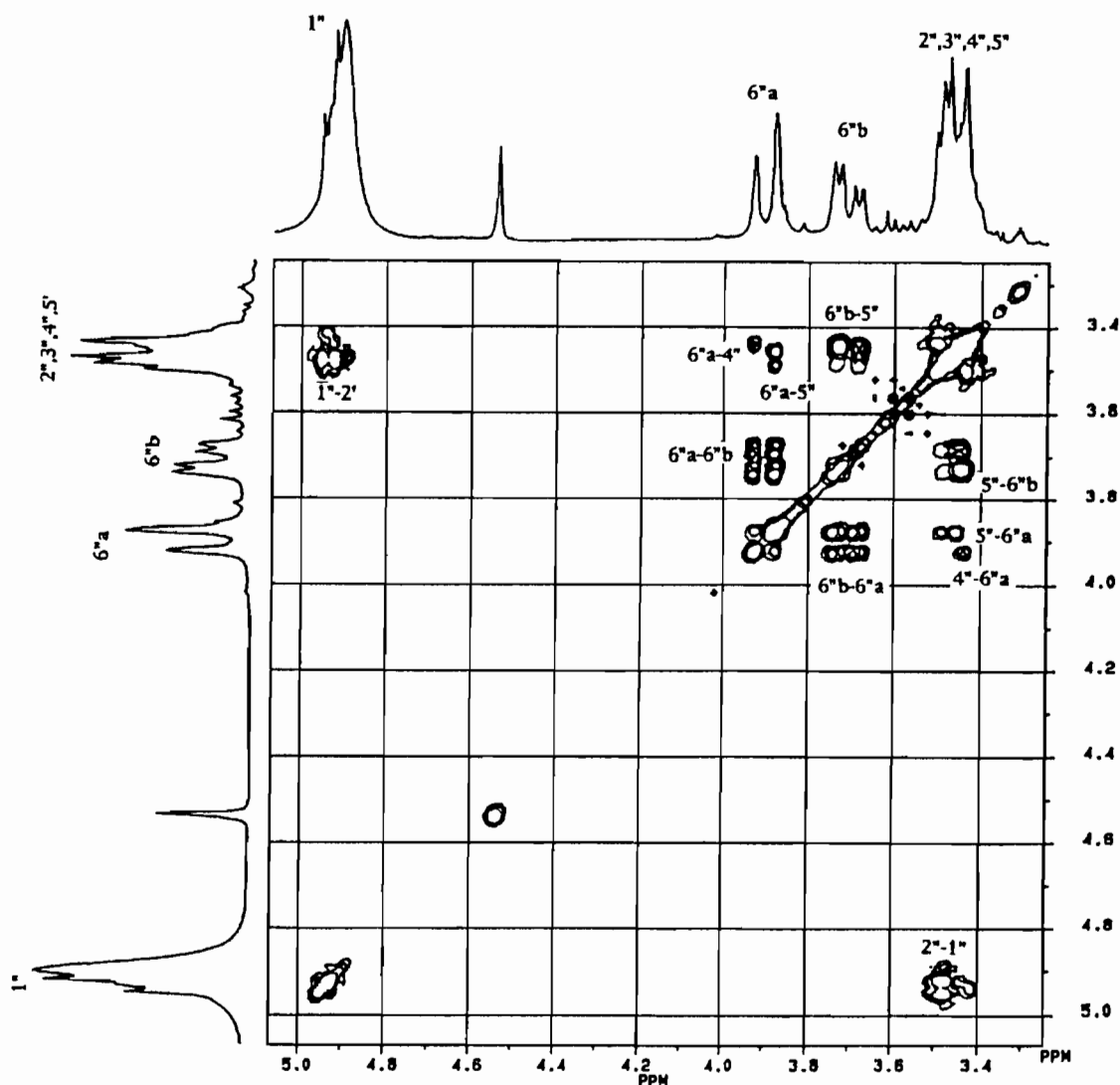


Figure 24. Agrandissement COSY du composé 3, zone des protons osidiques (250 MHz)

IV.3.2.2. Analyse des spectres RMN ^{13}C et XHCORR

Le spectre de RMN ^{13}C et les expériences DEPT (Figure 25) permettent de dénombrer six carbones quaternaires, parmi lesquels un carbonyle à δ 168,1 (s, C-7'). Les cinq autres correspondent à ceux

Les signaux des méthines aromatiques sont de double intensité à δ 130,7 (s, C-2 et C-6) et δ 117,7 (s, C-3 et C-5) et corrélient dans le spectre de corrélation hétéronucléaire directe XHCORR (Figure 26) avec les deux doublets à δ 7,37 et δ 7,11 confirmant la symétrie du système aromatique AA'XX' *para*-disubstitué.

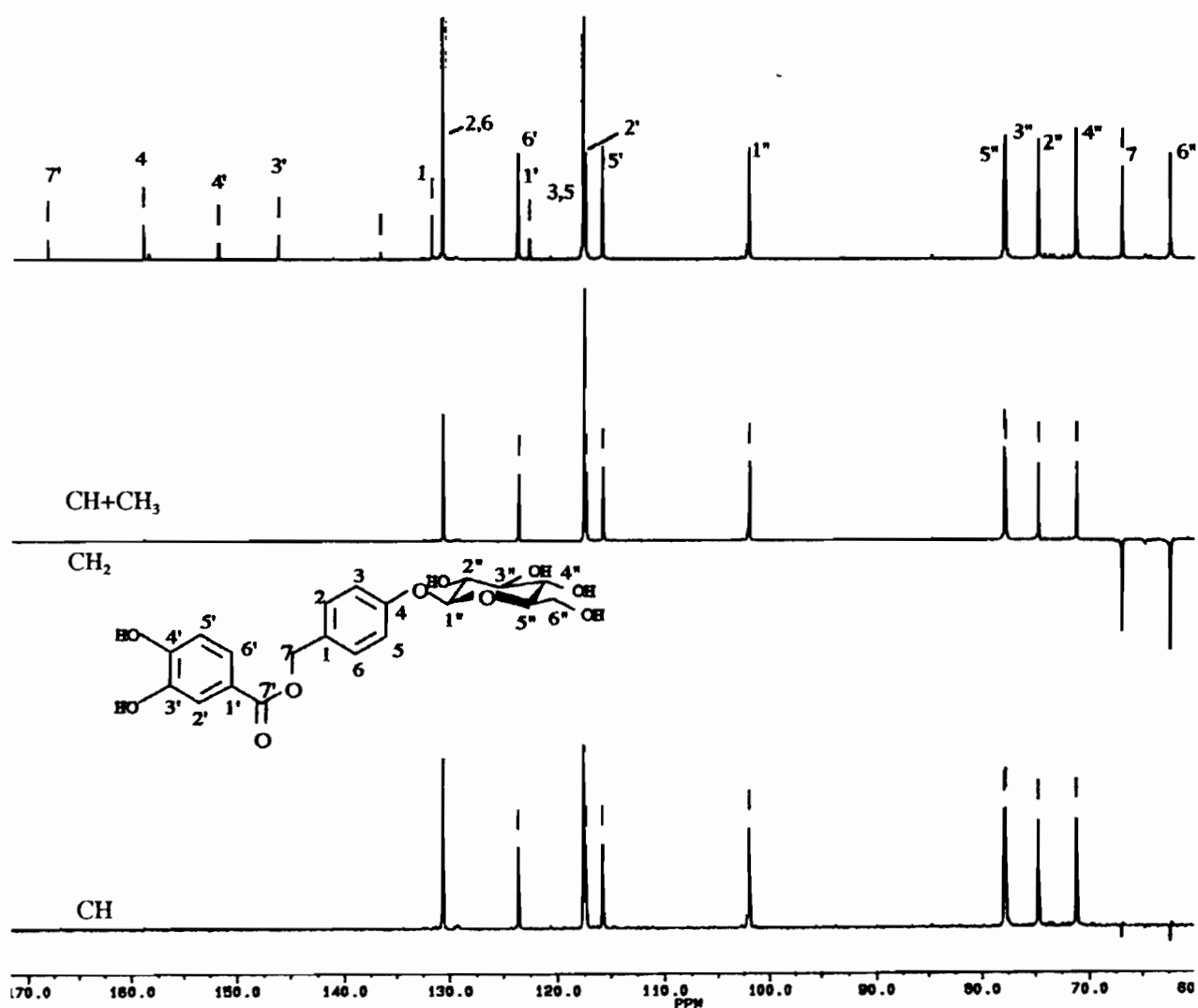


Figure 25. Spectres de RMN ^{13}C (62,9 MHz) et DEPT du composé 3

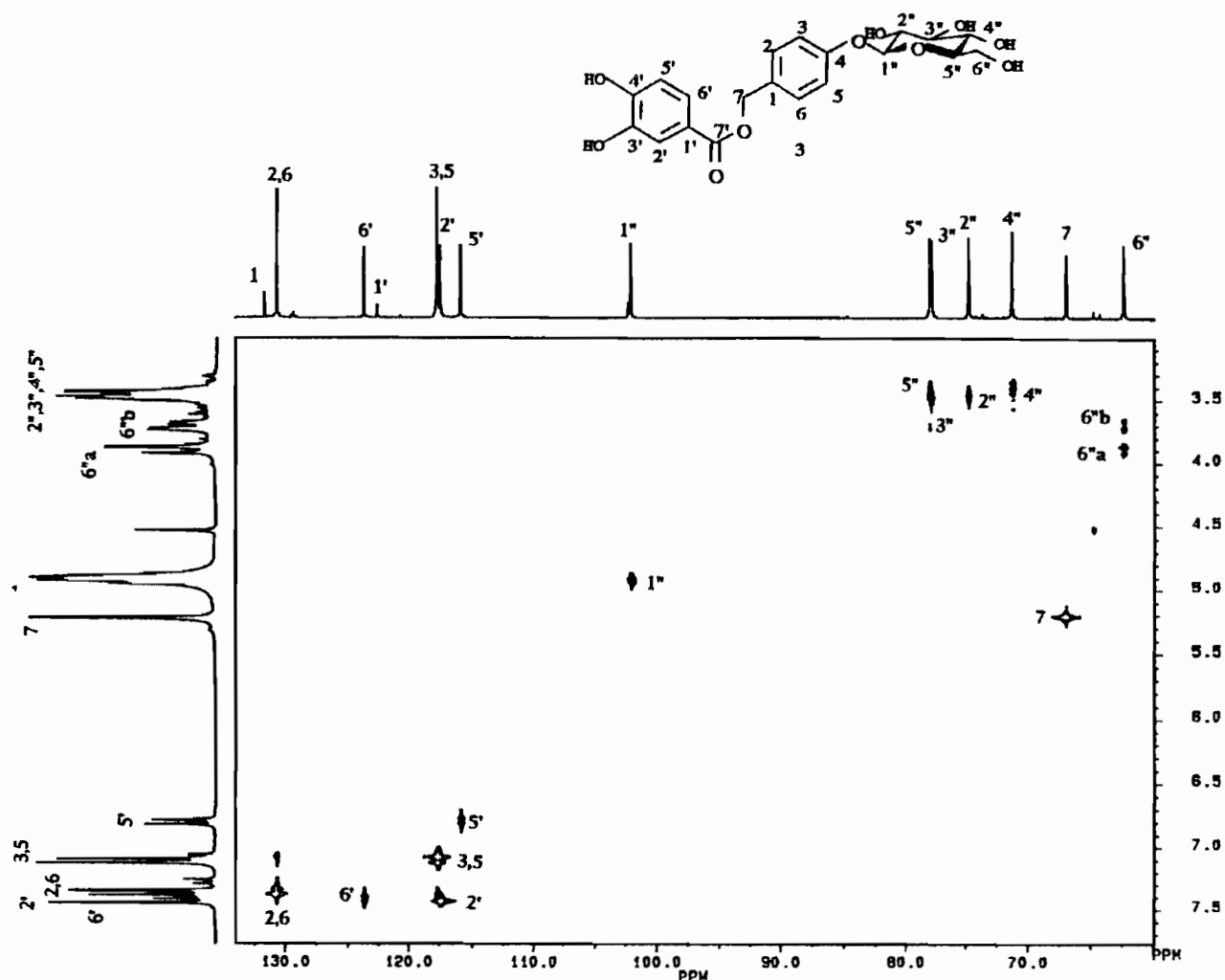


Figure 26. Spectre XHCORR de corrélation hétéronucléaire directe du composé 3

Les trois autres CH aromatiques à 115,9 (C-5'), 123,7 (C-6') et 117,4 (C-2') ppm corrélient respectivement au proton situé à 6,8 et au massif de 2H à 7,41-7,42 ppm. Ces corrélations confirment la présence d'un noyau benzénique trisubstitué (système ABX).

L'unité osidique comprend 6 carbones dont un CH₂ qui couple avec le système oxyméthylénique à 3,7 et 3,9 ppm. Le proton anomère possède son carbone à 102,1 ppm, déplacement chimique caractéristique d'une liaison de type "éther". Il s'agit d'un hexose. Sa nature exacte a été déterminée d'après ses déplacements chimiques carbones qui correspondent à ceux d'un D-glucose.¹¹³ La constante de couplage $^3J_{1'',2''}$ de 7,4 Hz est caractéristique d'une liaison β où les protons H-1'' et H-2'' sont *trans*-diaxiaux.

Dans la zone des carbones osidiques, le dernier carbone oxyméthylène à δ 67,0 (t, C-7) corréle avec le singulet des 2H isolés à δ 5,22. Un autre agrandissement, de la zone osidique (Figure 27) permet

l'attribution des protons osidiques H-2'' à H-5'' à partir de leur carbone. Le H-2'', H-3'' et H-4'' apparaissent comme des signaux (triplets) à grande constante de couplage signifiant qu'ils occupent des positions *trans*-diaxiales.

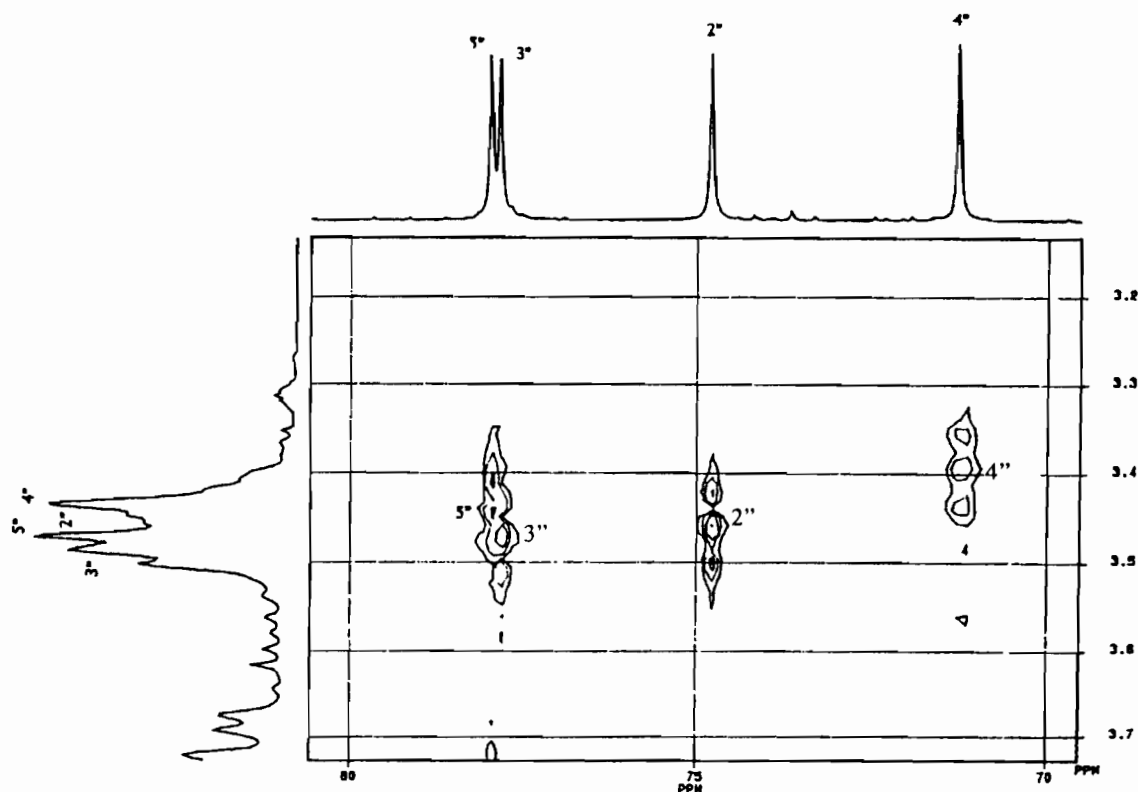


Figure 27. Agrandissement de la zone osidique du composé 3 de l'expérience XHCORR

IV.4.2.3. Analyse des spectres COLOC et NOESY

Les corrélations $^3J_{CH}$ du C quaternaire à 131,7 ppm avec H-5 et H-3, et de celui oxygéné à 158,9 ppm avec H-2 et H-6 permettent leur attribution respective au C-1 et au C-4 d'un système 4-hydroxylbenzylalcool (Figure 28, Figure 29). Le groupement oxyméthylène benzylique à 5,22 ppm corréle au C-1 et également aux CH équivalents C-2 et C-6 (Figure 29).

La partie osidique peut être fixée sur le C-4 du noyau benzénique du fait de l'observation d'une corrélation entre ce carbone et l'anomère du glucose H-1'' (Figure 29). Cette position a été également corroborée par un effet NOE dans l'expérience NOESY (Figure 30) entre le H-1'' du glucose et le massif des protons aromatiques H-3/H-5.

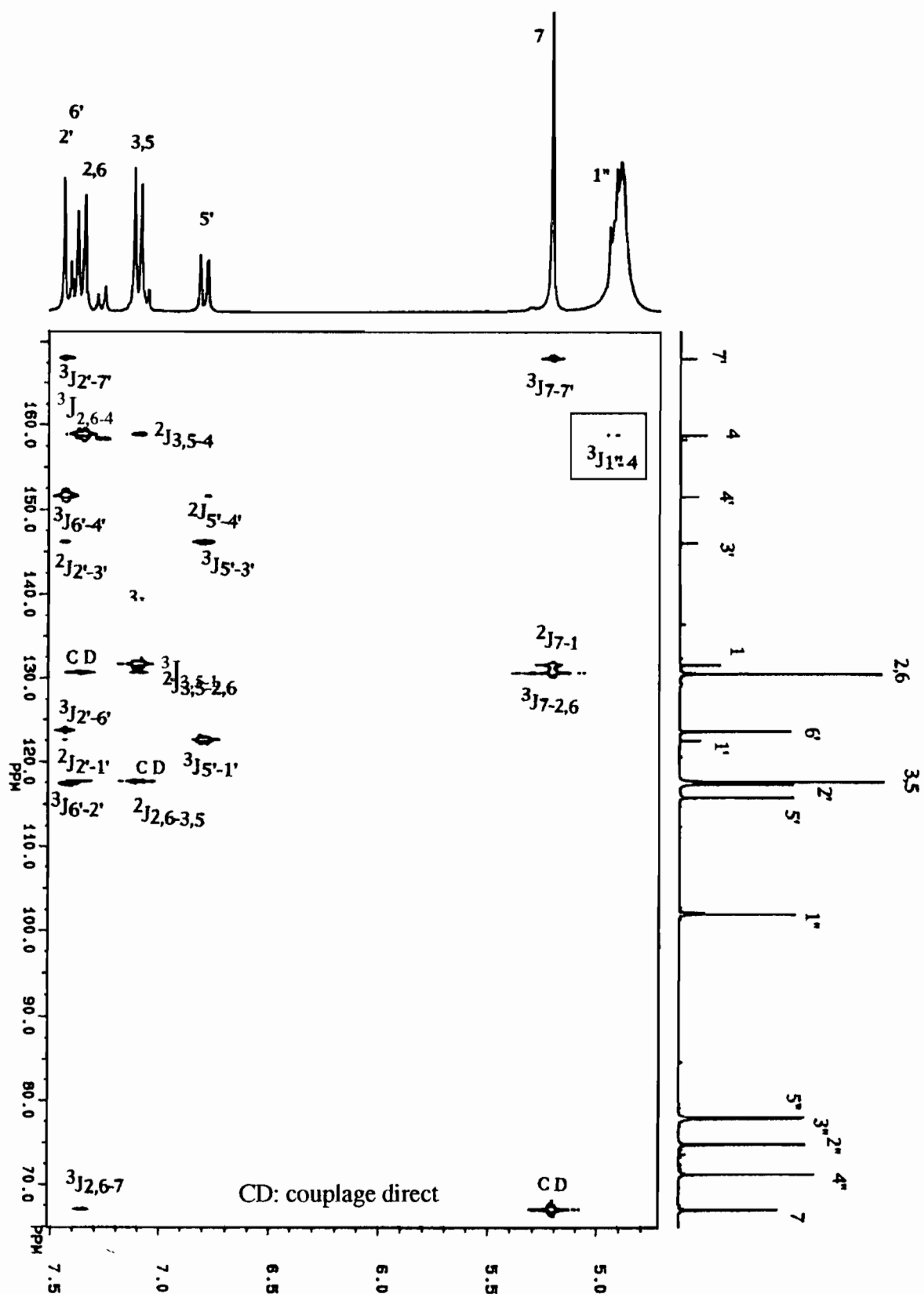


Figure 28. Spectre COLOC du composé 3

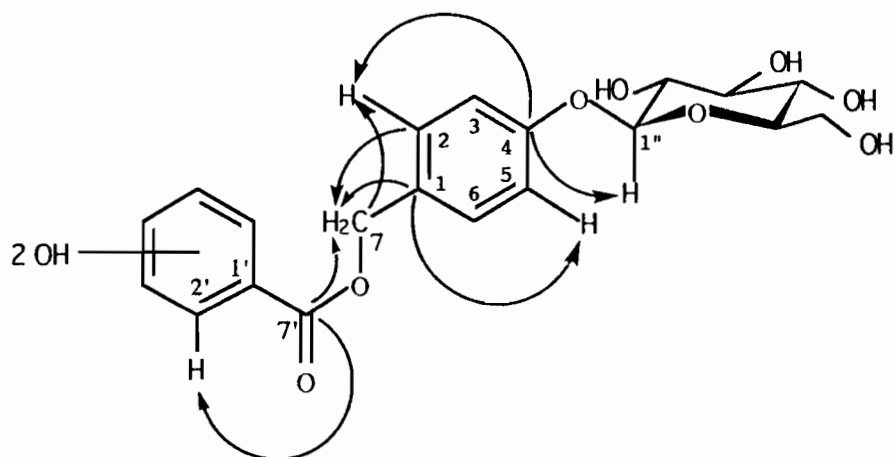


Figure 29

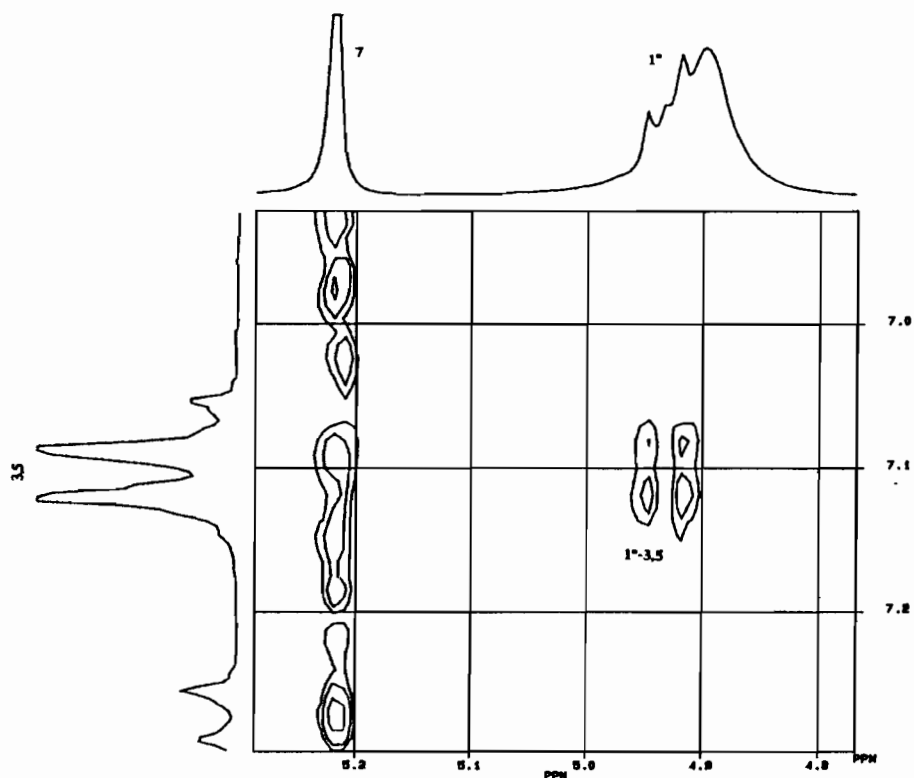


Figure 30. Agrandissement du spectre NOESY du composé 3

Etant donnée l'attribution du C-1 à δ 131,7 (s, C-1), le seul carbone quaternaire non oxygéné qui reste à attribuer est le C-1' à δ 122,6 qui porte le carbonyle ester, COOR-7'.

D'après l'agrandissement COLOC (Figure 31), les deux possibilités de substitution pour la partie benzoyl, A (*ortho*) ou B (*para*) de la Figure 32 peuvent être justifiées par les mêmes corrélations $^2J_{CH}$ et $^3J_{CH}$ dans la carte 2D puisque H-2' et H-6' sont pratiquement superposés.

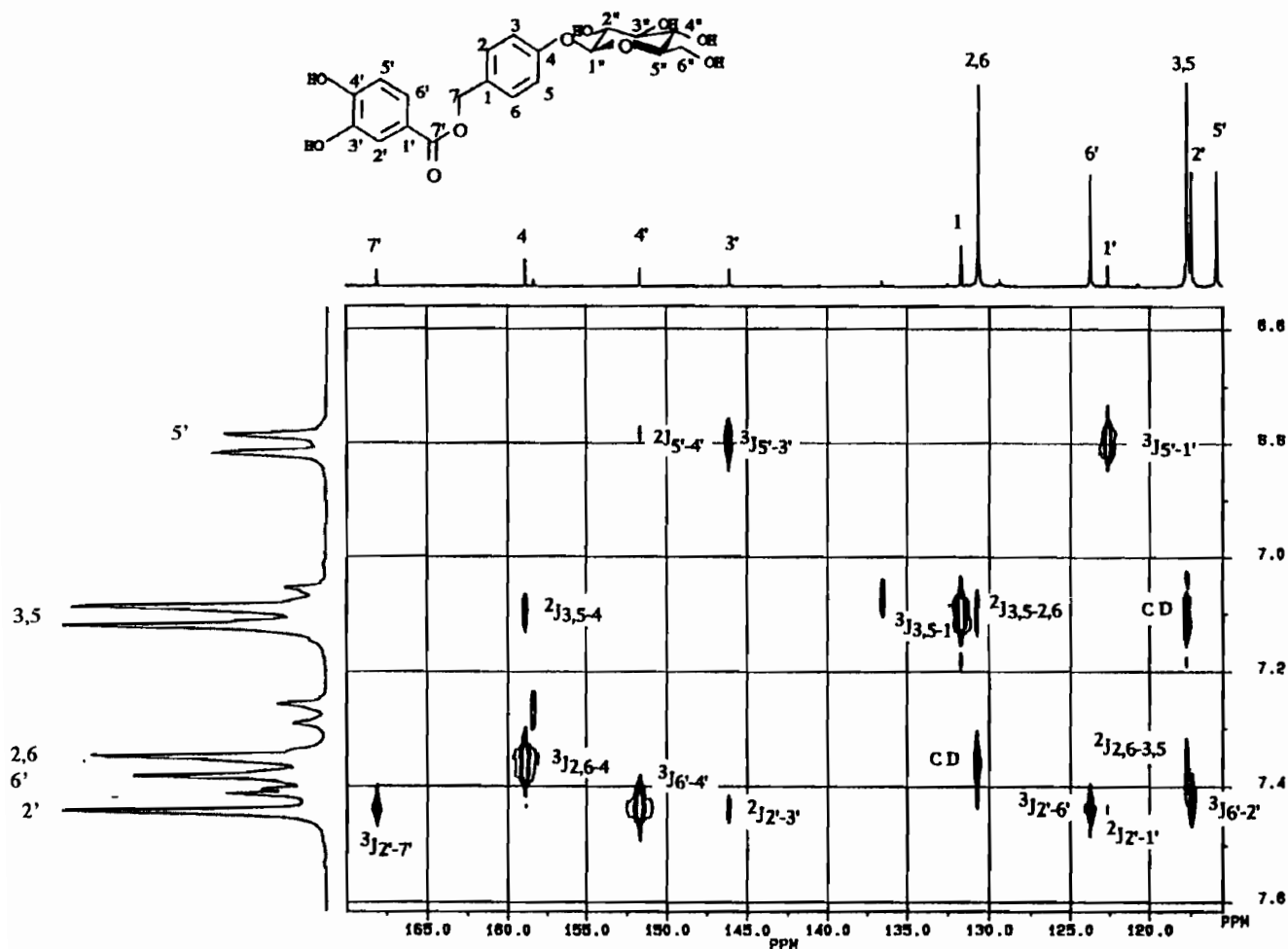


Figure 31. Agrandissement du spectre COLOC du composé 3

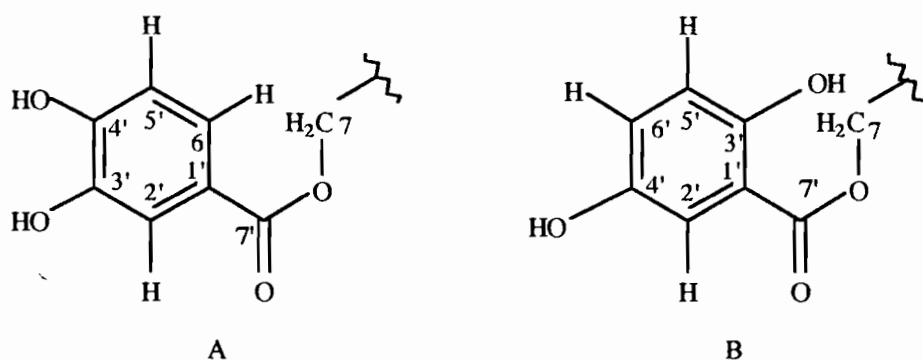
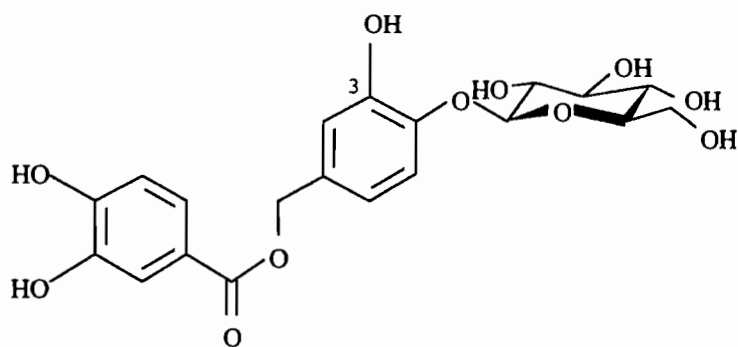


Figure 32

Les déplacements déblindés par rapport à la résonance du proton du benzène (7,26 ppm), des résonances du H-2' (δ 7,42) et H-6' (δ 7,41), obéissent à leur position *ortho* par rapport au substituant carbonyle d'ester, qui produit le même effet de déblindage sur ces deux protons par anisotropie diamagnétique (Figure 32 A). Si H-6' se trouvait en *para* du carbonyle d'ester (Figure 32 B), son déplacement chimique serait très différent du déplacement du H-2', car il ne serait pas influencé par l'anisotropie du carbonyle d'ester au même degré que H-2', en présentant certainement un déblindage plus faible. Néanmoins, la valeur de 7,85 ppm attendue pour les protons *ortho* dans l'acétophénone, est déplacée de $\Delta = -0,45$ ppm dans le composé **3** à cause du groupe OH-3', qui est un groupe blindant de type *ortho-para*. Cet argument est corroboré par un déplacement du H-5' fortement blindé par rapport à la résonance des protons du benzène jusqu'à 6,80 ppm à cause du second groupe OH-4' *ortho*. Le second noyau aromatique du composé **3** est donc un ester d'acide 3',4'-dihydroxybenzoïque.

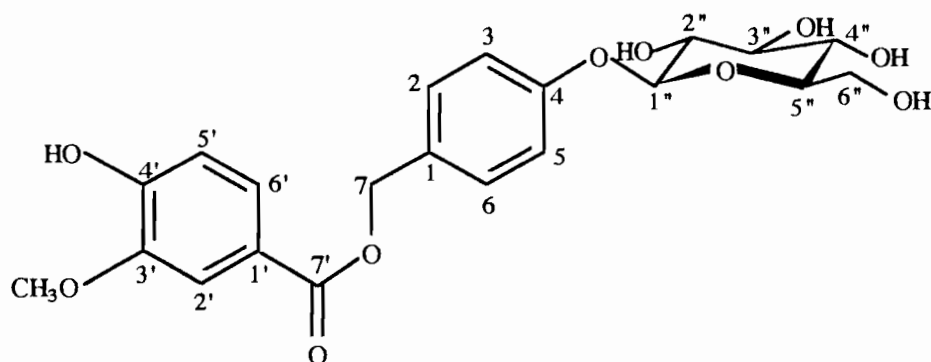
Finalement la corrélation $^3J_{CH}$ entre le carbonyle d'ester C-7' à 168,1 ppm de l'ester 3',4'-dihydroxybenzoate et les protons méthyléniques (H-7) de l'alcool 4-hydroxybenzylique permet d'attribuer la structure définitive du composé **3** comme un nouveau composé: le 4-(O- β -D-glucopyranosyl)-hydroxy-7-(3',4'-dihydroxy-benzoyl)-benzyl alcool que nous avons appelé amburoside A. D'après la littérature, le composé **3** correspondrait à la protocatechuoyl-3-deoxycalleryanine.¹¹⁴



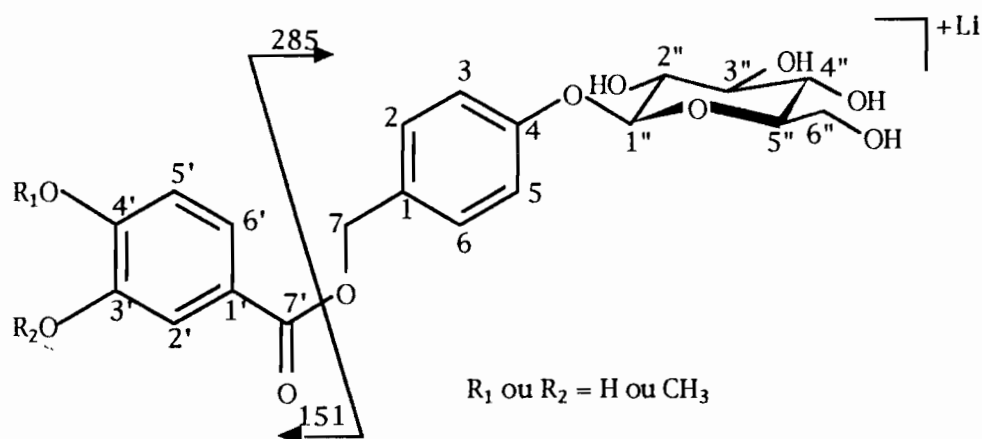
protocatechuoyl-calleryanine

IV.4.3.Composé 4

Le composé **4** est obtenu sous la forme de cristaux blancs de point de fusion 130-132 °C, et a été nommé amburoside B. L'analyse en chromatographie sur couche mince montre un R_f plus élevé par rapport au composé **3**, sous-entendant un nombre moindre d'hydroxyles par rapport à **3**. Ses données spectrophotométriques d'infrarouge similaires à ceux du **3** signalent une fonction ester aromatique (1710 et 1240 cm^{-1}), des systèmes aromatiques (1610 cm^{-1}) et des fonctions hydroxylées (3380 cm^{-1}). La bande d'absorption maximale à λ 220 nm en UV correspond au groupe chromophore d'ester conjugué.

**4** amburoside B

Le spectre de masse obtenu en FAB mode positif montre un pic moléculaire lithié à m/z 443 $[\text{M}+\text{Li}]^+$ analysé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{10}\text{Li}$. Le composé **4** comprend 14 uma supplémentaires par rapport au composé **3**, pouvant provenir de la substitution d'un hydroxyle par un méthoxy. Les fragments à m/z 285 et à m/z 151 peuvent être expliqués selon la perte de l'ester benzoïque. Ceci traduisant que le méthoxy se situe sur l'hydroxybenzoate.



IV.4.3.1. Analyse des spectres de RMN

Toute la spectrométrie de RMN du composé **4**, présente des caractéristiques très similaires à celles manifestées par le composé **3**. Le spectre RMN ^1H (Figure 33), montre les deux systèmes aromatiques isolés (δ 7,70 à 6,80), un oxyméthylène d'alcool benzylique, δ 5,26 (2H, *s*, H-7), et une partie glycosylée (δ 5,00 à 3,40).

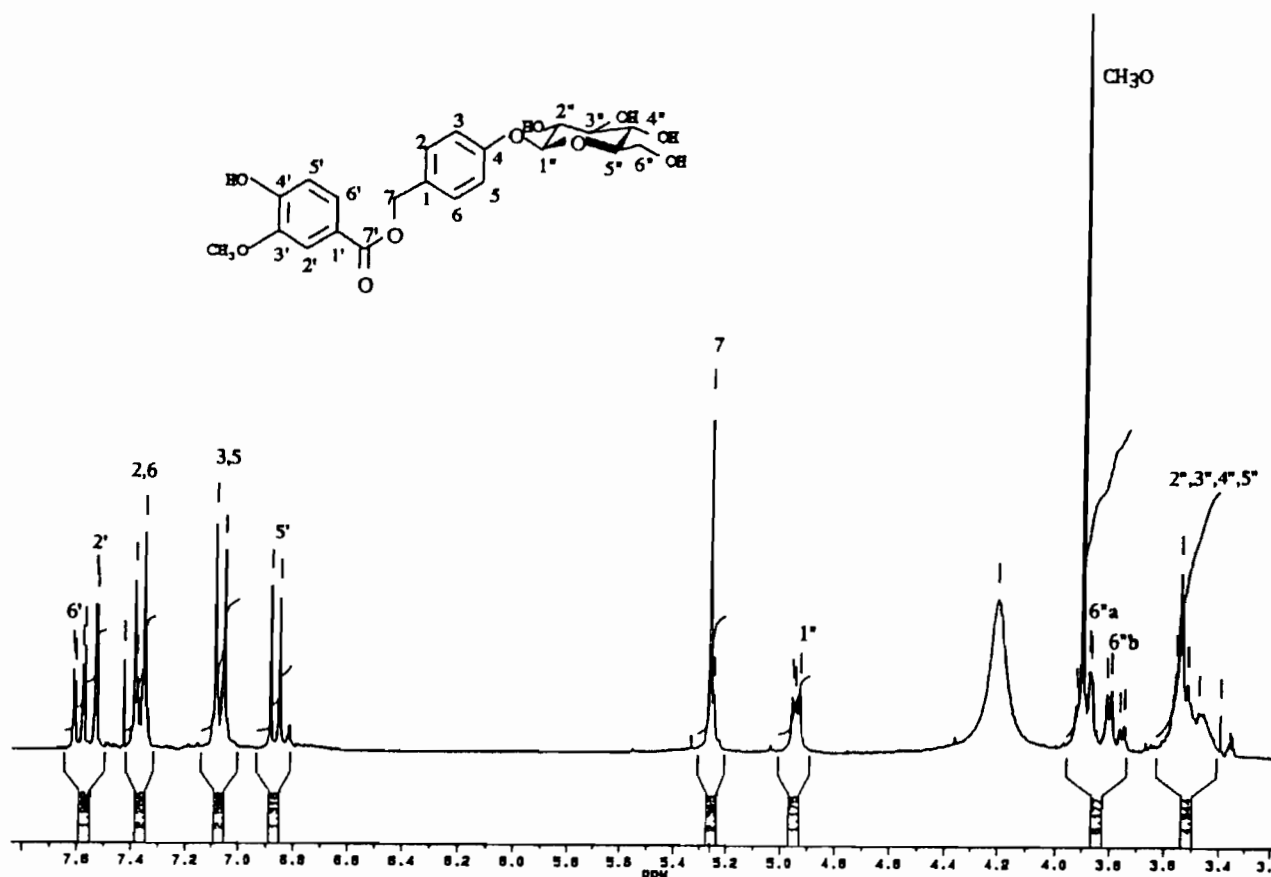


Figure 33. Spectre de RMN ^1H du composé **4** (250 Mhz)

La différence fondamentale pour **4** réside dans la présence d'un groupe méthoxy à δ 3,90 (3H, *s*, MeO). Les déplacements chimiques légèrement blindés des protons H-2' à δ 7,53, H-6' à δ 7,59, et H-5' à δ 6,87 par rapport aux valeurs observées dans le composé **3**, confirment que ce méthoxy se situe sur la partie benzoate. Les autres protons aromatiques H-2, H-6 et H-3, H-5 de l'alcool *para*-hydroxy benzylique, ne subissent pratiquement pas de modifications de leurs déplacements chimiques par rapport à ceux observés dans **3**.

Le carte COSY de **4** montre clairement l'établissement des trois systèmes de spins mentionnés pour **3**:

- un alcool 4-hydroxybenzylique,
- un ester benzoïque hydroxylé et méthoxylé en 3' ou 4',
- un β -D-glucose

Les spectres de RMN ^{13}C et XHCORR (Figure 34) enregistrés dans $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ 9:1 apparaissent très ressemblants à ceux obtenus avec le composé **3**. Un carbone supplémentaire apparaît à δ 56,1 ppm; il s'agit d'un méthyle correspondant à celui du groupe méthoxy.

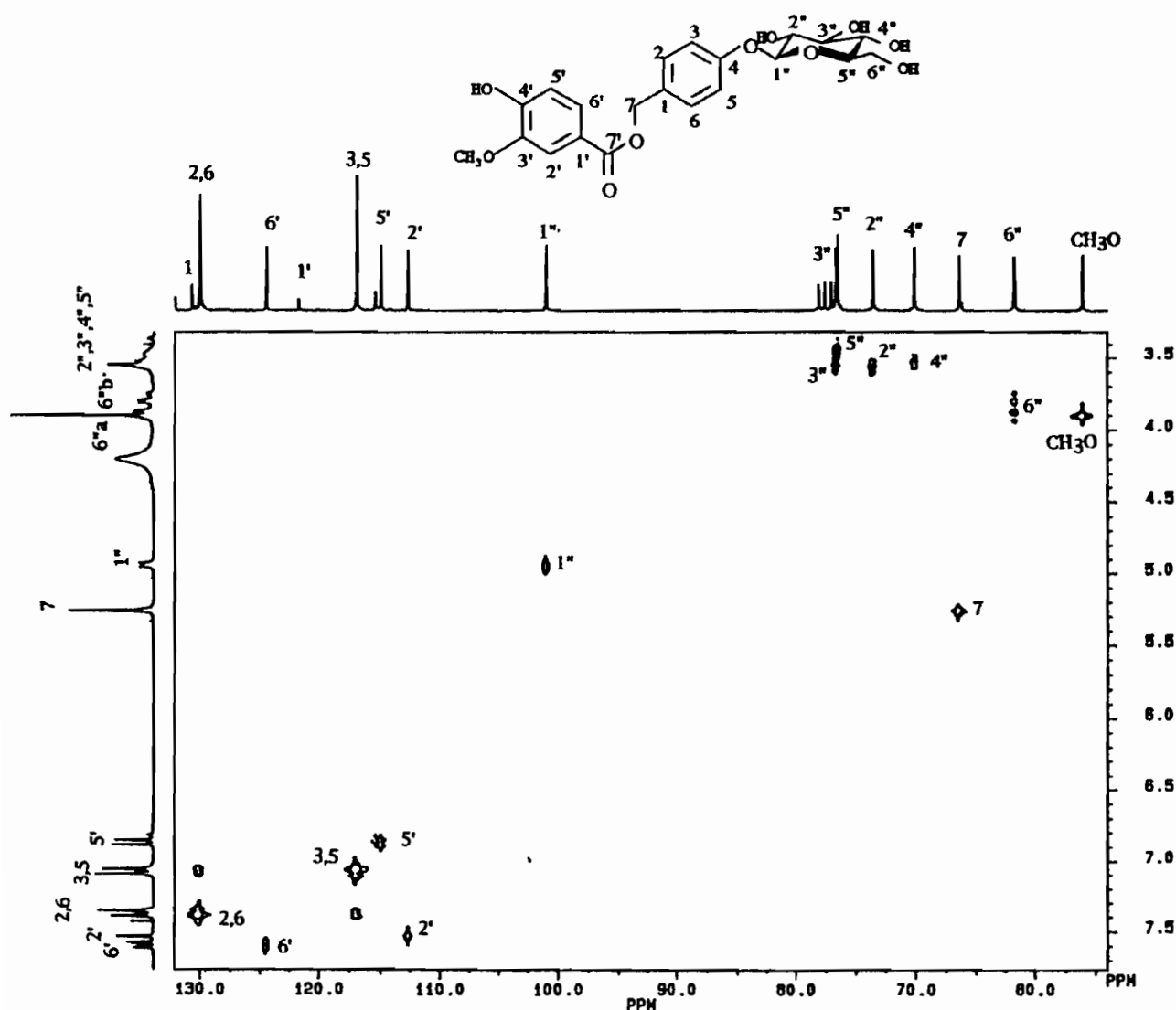


Figure 34. Spectre XHCORR de corrélation hétéronucléaire directe du composé **4**

Comme pour le composé précédent, le glucose est fixé sur l'alcool benzylique. Une corrélation hétéronucléaire $^3J_{CH}$ entre le proton anomérique à δ 4,95 (H-1'') et le carbone quaternaire δ 157,5 (C-4) est visible dans la Figure 35 de l'expérience COLOC. D'une autre part, l'effet NOE entre H-1'' et H-3/H-5 dans l'expérience NOESY confirme la fixation du glucose sur l'oxygène en 4 de l'alcool benzylique.

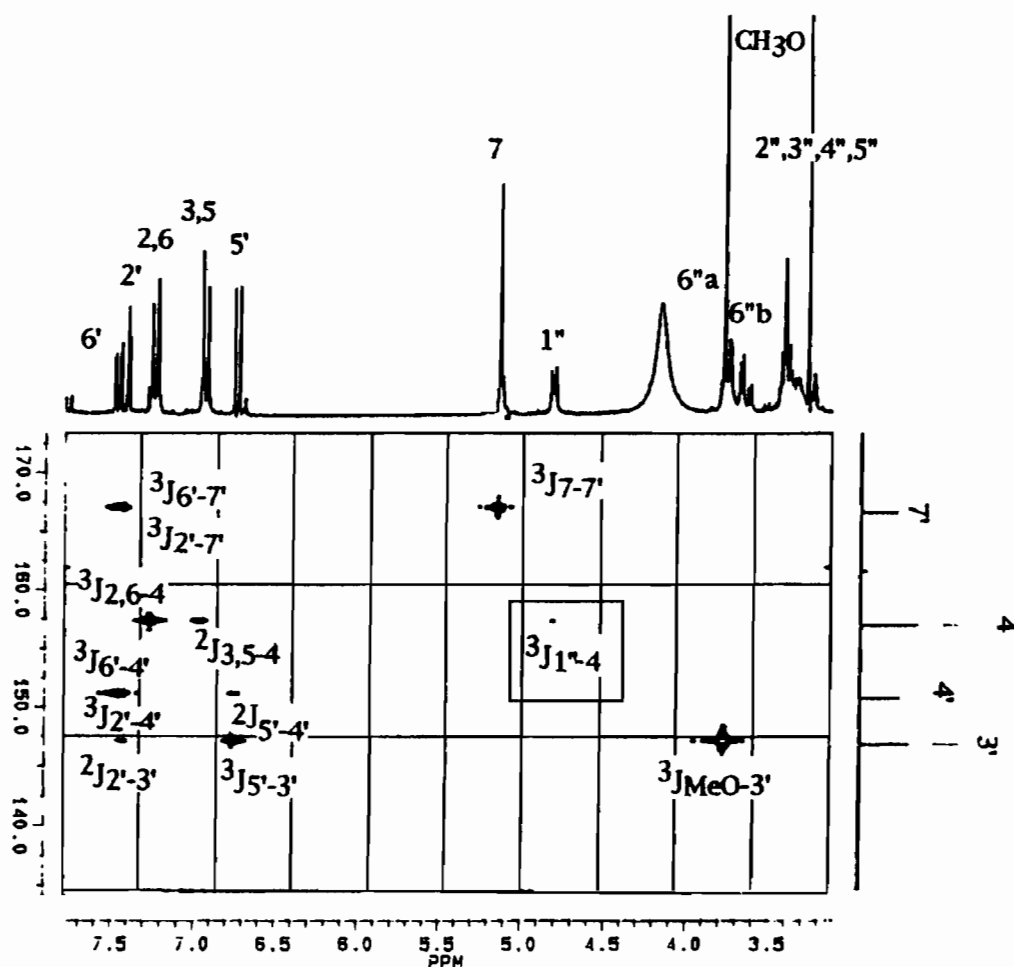


Figure 35. Agrandissement du spectre COLOC

Les protons du méthoxy possèdent une corrélation $^3J_{CH}$ dans l'expérience COLOC avec le carbone quaternaire oxygéné à 147,4 ppm qui est le C-3' (Figure 35). En effet, celui-ci corrèle également avec

les protons H-2' et H-5'. L'effet NOE entre les protons du méthoxy et H-2' à δ 7,53, dans le spectre NOESY (Figure 36) confirme la position méthoxylée en 4' de l'acide benzoïque.

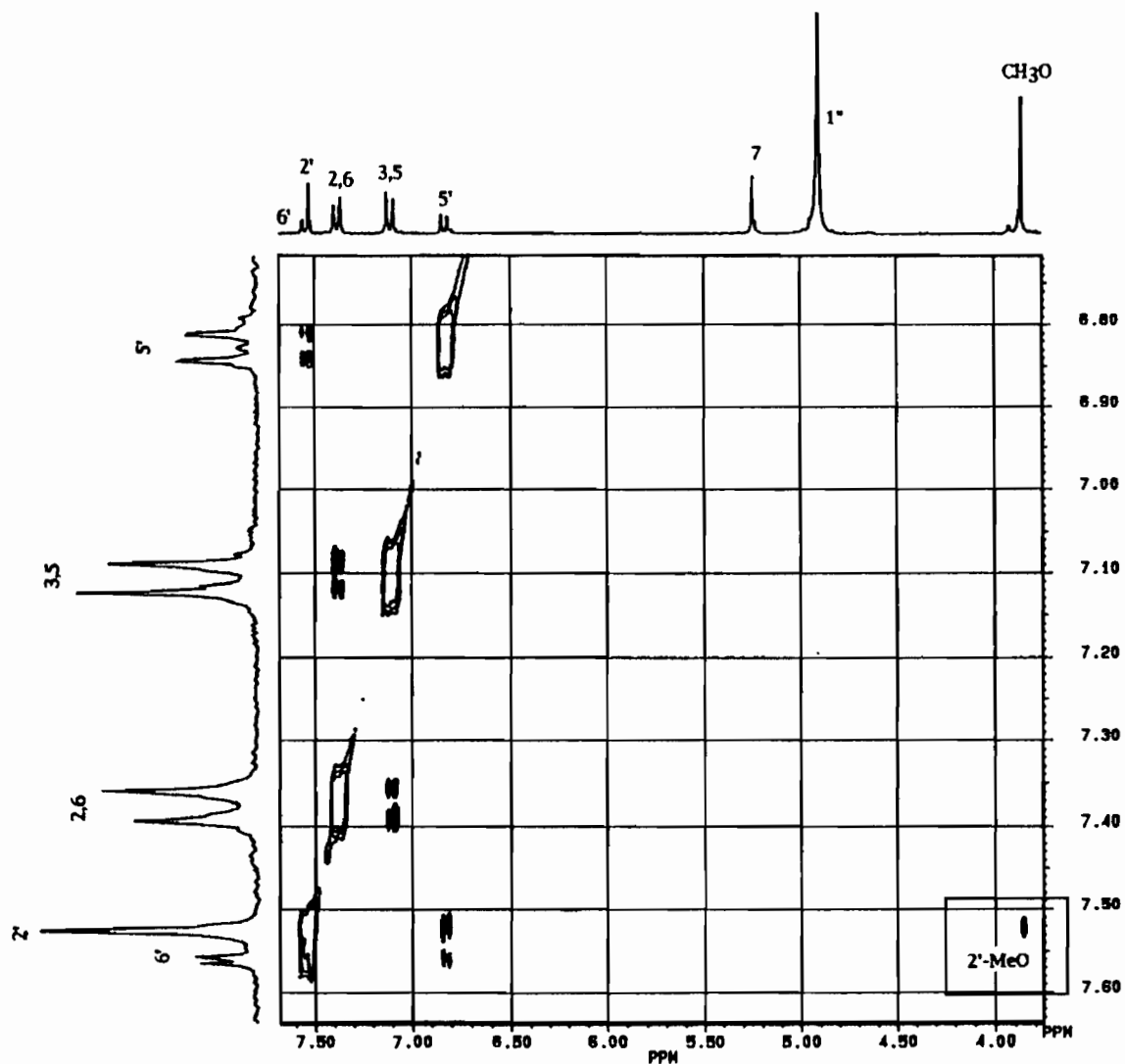
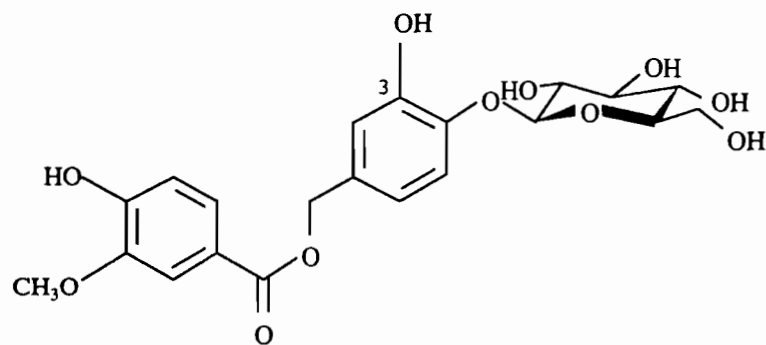


Figure 36. Effet NOE entre $\text{CH}_3\text{-O-}$ et H-2' du composé 4

Ce nouveau composé est l'alcool 4-(O- β -D-glucopyranosyl)-hydroxy-7-(3'-méthoxy-4'-hydroxy-benzoyl)-benzylique 4, dérivé du vanilloyl-calléryanine,¹¹⁴ et donc nommé vanilloyl-3-déoxycalléryanine.



vanilloyl-calleryanine

Tableau 38. Données de RMN des composés 3 et 4 à 250 MHz (^1H) et 62,9 MHz (^{13}C)

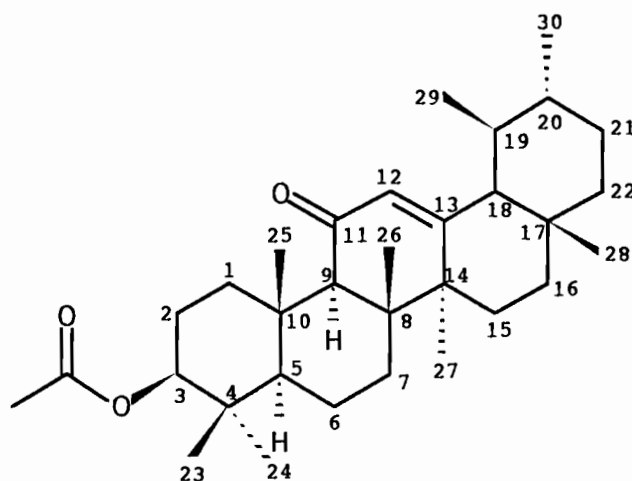
Atome	Amburoside A (3)*		Amburoside B (4)†	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
Genine				
1'		122,6		121,7
2'	7,42 d (2,0)	117,4	7,53 d (1,9)	112,6
3'		146,1		147,4
4'		151,7		151,3
5'	6,80 d (8,5)	115,9	6,87 d (8,2)	114,9
6'	7,41 dd (8,5, 2,0)	123,7	7,59 dd (8,2, 1,9)	124,4
7'		168,1		167,1
CH ₃ O			3,90 s	56,1
1		131,7		130,7
2, 6	7,37 d (8,4)	130,7	7,36 d (8,6)	130,0
3, 5	7,11 d (8,4)	117,7	7,08 d (8,6)	116,9
4		158,9		157,5
7	5,22 s	67,0	5,26 s	66,4
Glucose				
1''	4,92 d (7,4)	102,1	4,95 d (7,0)	101,0
2''	3,46 t §	74,8	3,56 t §	73,6
3''	3,48 t §	77,9	3,54 t §	76,7
4''	3,39 t §	71,3	3,52 t §	70,1
5''	3,44 m §	78,0	3,44 m §	76,5
6''a	3,90 dl (11,7)	62,4	3,90 dd (12,3, 1,9)	61,8
6''b	3,70 dd (11,7, 4,3)		3,77 dd (12,3, 4,4)	

§: Valeurs du déplacement chimique et multiplicités établis d'après les taches de corrélations hétéronucléaires directes ($^1J_{\text{CH}}$) de l'expérience XHCORR; *Enregistré dans CD₃OD; †Enregistré dans CD₃OD-CDCl₃ 1:9

IV.5.Détermination de structure des composés de *Qualea paraensis*

IV.5.1.Composé 5

Le composé **5** se présente sous la forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans des solvants peu polaires et pour lequel les analyses spectroscopiques ont fourni une structure triterpénique: la 3- β -acétoxyurs-12-en-11-one, appelée aussi acétate de néoilexonol ou acétate de 11-oxo- α -amyrine, rapportée précédemment comme le dérivé acétylé hémisynthétique de la 3- β -hydroxyurs-12-en-11-one.^{115,116,117} Ceci constitue le premier isolement de l'acétate de neoilexonol comme substance naturelle.



5 3 β -acétoxyurs-12-en-11-one

IV.5.1.1.Analyse des spectres de RMN

La nature triterpénique du composé **5** peut être déduite des observations suivantes sur le spectre de RMN ^1H (Figure 37):

- cinq singulets correspondant à six méthyles tertiaires dont quatre situés à la jonction des cycles: δ 1,31 (3H), 1,20 (3H), 1,18 (3H) 0,84 (3H) et 0,90 (6H)
- deux doublets pour deux méthyles secondaires à δ 0,96 (3H, $J_{39,20} = 5,0$ Hz) et δ 0,81 (3H, d , $J_{29,19} = 5,0$ Hz)
- un massif de plusieurs protons non analysable de δ 1,00 à 2,20 qui correspond aux CH et CH_2 des cycloalcanes.

Ces signaux s'accordent avec un squelette de type ursane. Cette hypothèse est confirmée par le spectre de RMN ^{13}C J modulé où on dénombre trente deux carbones dont huit sont des méthyles qui corrélient dans l'expérience HMQC aux 5 singulets et aux 2 doublets décrits dans le spectre proton. Trois

carbones CH à δ 61,4 (C-9), 59,0 (C-18) et 55,0 (C-5), sont les méthines du squelette ursane plus déblindés du fait de leur situation en jonction de cycles.

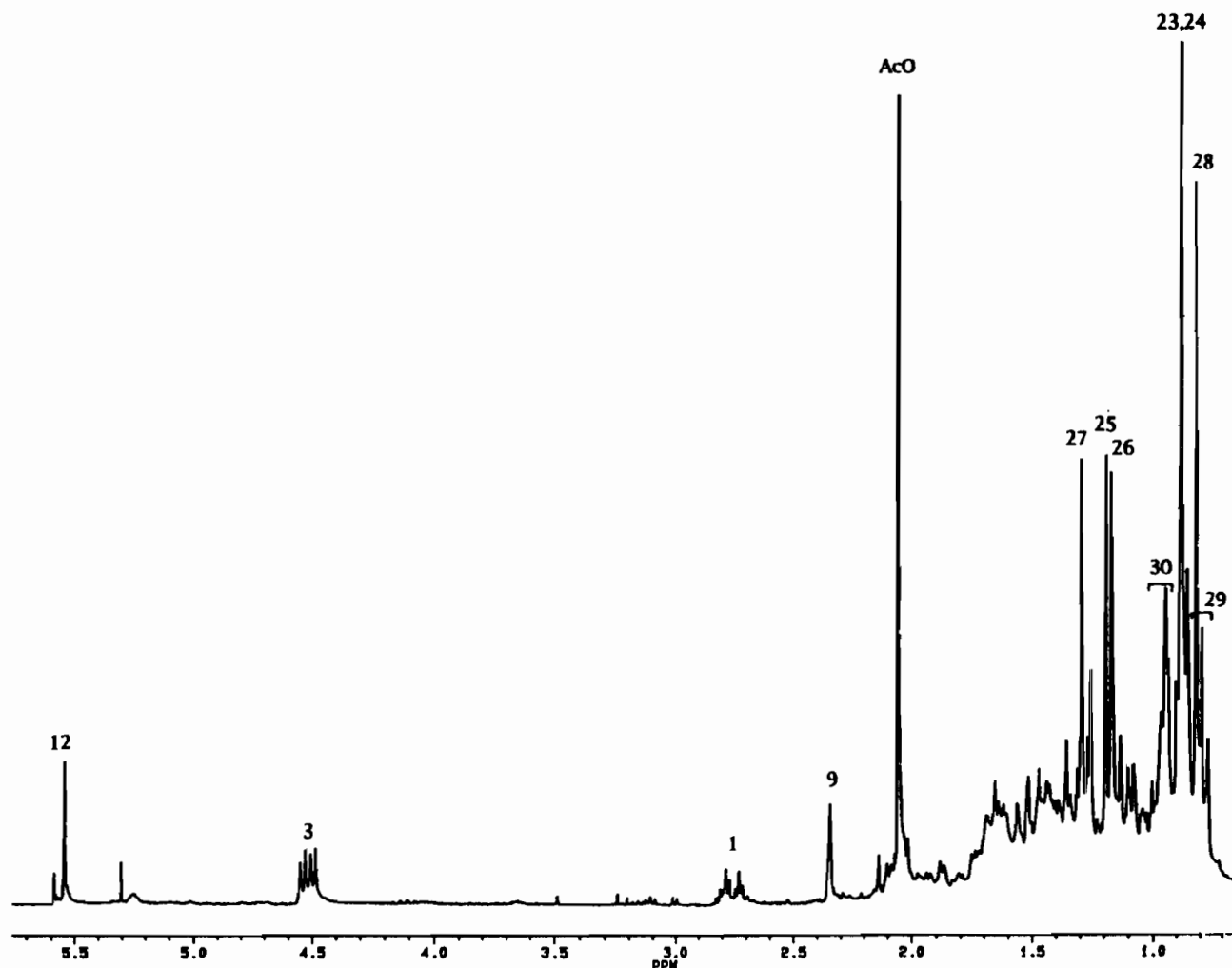


Figure 37. Spectre de RMN ^1H du composé 5 (250 MHz)

Un carbonyle est détecté à 199,6 ppm, déplacement chimique caractéristique d'une fonction cétone. Deux carbones sp^2 , un CH à 130,4 ppm et un quaternaire à 165 ppm montrent la présence d'une double liaison trisubstituée. Le déblindage de ces carbones par rapport aux valeurs décrites pour le squelette Δ -12 ursène (124,3 et 139,3 ppm) sous-entendent leur proximité adjacente à la fonction cétonique. Cet arrangement est confirmé sur le spectre proton, par l'observation d'un singulet d'un proton éthylénique (H-12) à 5,55 ppm (corrélé en HMQC au CH à 130,4 ppm et en HMBC au C à 165 ppm) et d'un second singulet d'un proton légèrement déblindé à 2,34 ppm (H-9). Le composé 5 est un dérivé à squelette 11-oxo- Δ -12 ursène.

Hormis les 30 carbones du squelette 11-oxo- Δ -12 ursène, deux carbones supplémentaires résonnent à 21,3 (CH_3) et 171 (CO) ppm, traduisant la présence d'un groupe acétate. Le CH_3 corrèle en HMQC

ppm (*dd*, $J = 9,8$ Hz et $4,5$ Hz) et son carbone résonne à $80,6$ ppm. Celui-ci présente des corrélations avec les méthyles H-23 et H-24 d'après l'expérience HMBC. Les constantes de couplage de H-3 avec les deux protons H-2 indiquent qu'il se situe en position α -axiale.

L'analyse des corrélations $^2J_{\text{HC}}$ et $^2J_{\text{HC}}$ observées dans l'expérience HMBC, essentiellement à partir des 8 signaux protonés méthyliques (Figure 38), a permis d'attribuer les autres carbones du composé 5 sauf les C-2 et C-6.

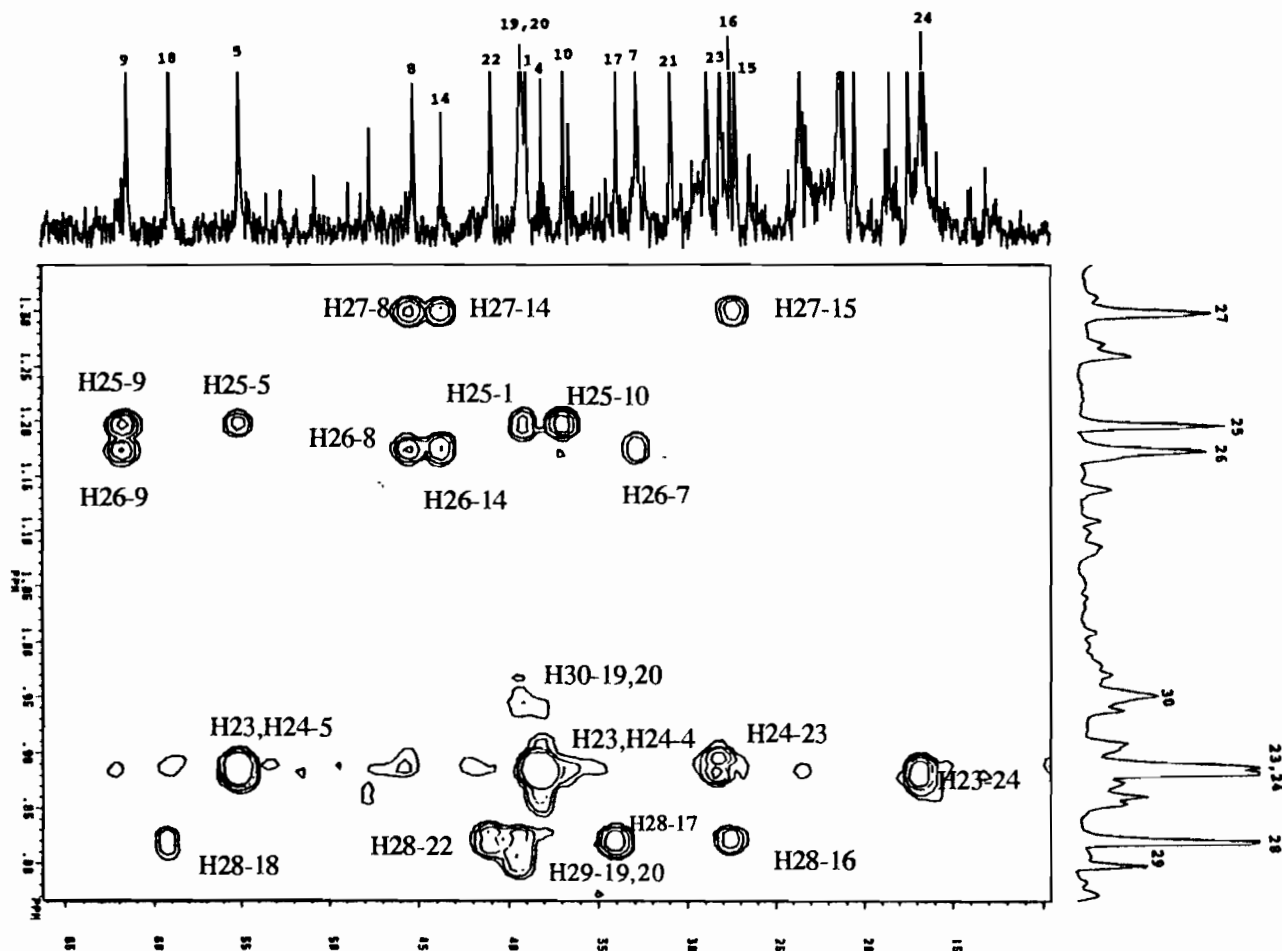


Figure 38. Spectre HMBC du composé 5, zone des méthyles

Les corrélations $^3J_{\text{HC}}$ et $^2J_{\text{HC}}$ données par l'expérience HMBC sont réunies dans le Tableau 39. Les attributions des spectres de RMN obtenues à travers l'analyse précédente sont réunies dans le Tableau 40.

Tableau 39. *Corrélations $^3J_{HC}$ et $^2J_{HC}$ relevées dans l'expérience HMBC du composé 5*

H	C
H-3	C=O (AcO)
H-9	1, 8, 10, 11
H-12	9, 14, 18
H-18	12, 13, 14, 17, 19, 20
H-23	3, 4, 5, 24
H-24	3, 4, 5, 23
H-25	1, 5, 9, 10
H-26	7, 8, 9, 14
H-27	8, 13, 14, 15
H-28	16, 17, 18, 22
H-29	19, 20
H-30	19, 20

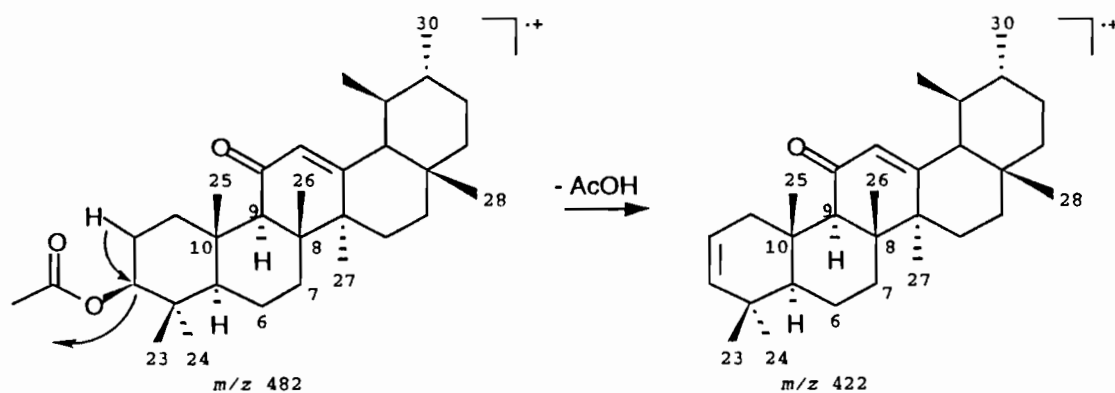
Tableau 40. *Données de RMN du composé 5, à 250 MHz (1H) et 75,0 MHz (^{13}C)*

Atome	1H	^{13}C	Atome	1H	^{13}C
1	2,72 <i>dt</i> (13,5, 3,5)	38,9	17		33,9
	1,09 <i>m</i>		18	1,55 <i>m</i>	59,0
2	1,63 <i>m</i>	23,6	19	0,91 <i>m</i>	39,2
3	4,50 <i>dt</i> (9,8, 4,5)	80,6	20	0,91 <i>m</i>	39,3
4		38,0	21	1,35 <i>m</i>	30,9
5	0,80 <i>m</i>	55,0	22	1,50 <i>m</i>	40,9
6	1,45 <i>m</i>	17,4		1,31 <i>m</i>	
7		32,8	23	0,90 <i>s</i>	28,1
8		45,1	24	0,90 <i>s</i>	16,7
9	2,34 <i>s</i>	61,4	25	1,20 <i>s</i>	16,5
10		36,8	26	1,18 <i>s</i>	18,5
11		199,6	27	1,31 <i>s</i>	20,5
12	5,55 <i>s</i>	130,4	28	0,84 <i>s</i>	28,8
13		165,0	29	0,81 <i>d</i> (5,0)	17,5
14		43,6	30	0,96 <i>d</i> (5,0)	21,1
15	2,14 <i>m</i>	27,7	AcO		171,0
	1,90 <i>m</i>			2,07 <i>s</i>	21,3
16	1,20 <i>m</i>	27,5			

Les données spectrales de RMN ^{13}C s'accordent avec celles rapportées pour la 11-oxo- α -amyrine¹¹⁸ sauf pour le C-2 à δ 23,6 qui se trouve blindé par rapport à la valeur de δ 27,3 rapportée dans la littérature. Ceci est dû à la présence de l'acétate sur le C-3. Une remarque relative au déblindage important du H-1 $_{eq}$ (δ 2,72) par rapport au H-1' $_{ax}$ à δ 1,09, s'explique d'après l'influence du cône d'anisotropie du carbonyle C-11. Le composé **5** a été précédemment synthétisé par acétylation de la 3 β -hydroxyurs-12-en-11-one, isolée des espèces *Canarium zeylanicum*,¹¹⁶ et *Ilex goshiensis*.¹¹⁷

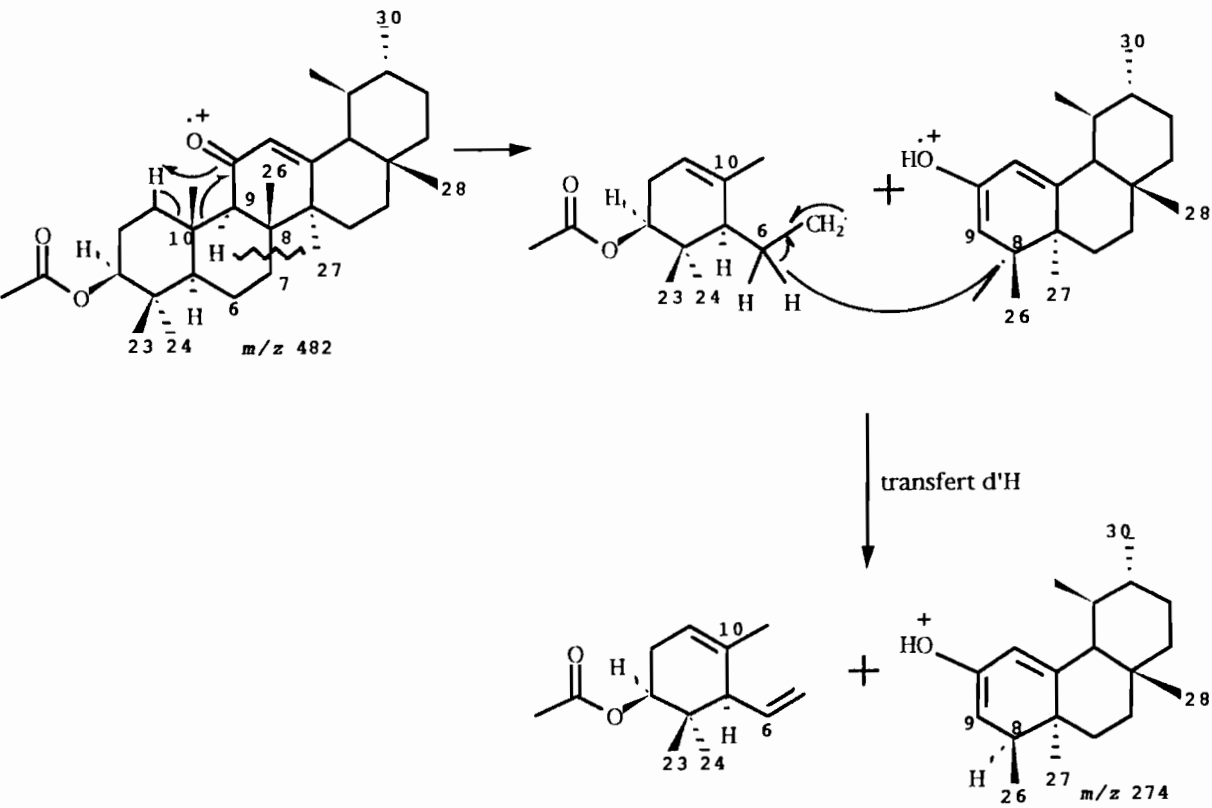
IV.5.1.2. Analyse du spectre de masse d'impact électronique

Le pic moléculaire du composé **5** confirme la masse supposée d'après l'élucidation structurale de RMN et apparaît à m/z 482 (analysé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_3$). Le composé **5** présente un spectre de masse d'IE avec une série de fragmentations caractéristiques d'un squelette Δ^{12} -ursène.¹¹⁹ Les pics les plus remarquables correspondent à ceux rapportés dans la littérature¹¹⁹ en série Δ^{12} -ursène pour le 3 β -acetoxyurs-12-en-11-one. A partir du pic de l'ion moléculaire, la perte d'une molécule d'acide acétique engendre le fragment à m/z 422 ($[\text{M}]^+ - \text{AcOH}$).



La rupture du cycle B au niveau des liaisons C_7-C_8 et C_9-C_{10} , s'effectue après un transfert d'H de la position 1 sur l'oxygène de la cétone et la migration d'un hydrogène sur le radical C-8 pour conduire à l'ion à m/z 274 ($[\text{M}]^+ - \text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_2$).

IV. Détermination de structure



IV.5.2.Composé 6

Le composé **6** possède un ion moléculaire à m/z 468 analysable en $C_{32}H_{52}O_2$. Le fragment à m/z 408 $[M-60]^+$ suggère la présence d'un acétate. Il s'agit comme pour le composé précédent d'un dérivé triterpénique acétylé.

IV.5.2.1.Analyse du spectre RMN 1H

Le fait d'observer huit fins singulets entre 0,85 et 1,16 ppm, indique la présence de huit groupes méthyliques isolés placés sur des carbones quaternaires ou des méthyles angulaires en jonction des cycles du triterpène. A 2,02 ppm apparaît un singlet correspondant au méthyle de l'acétate (Figure 39).

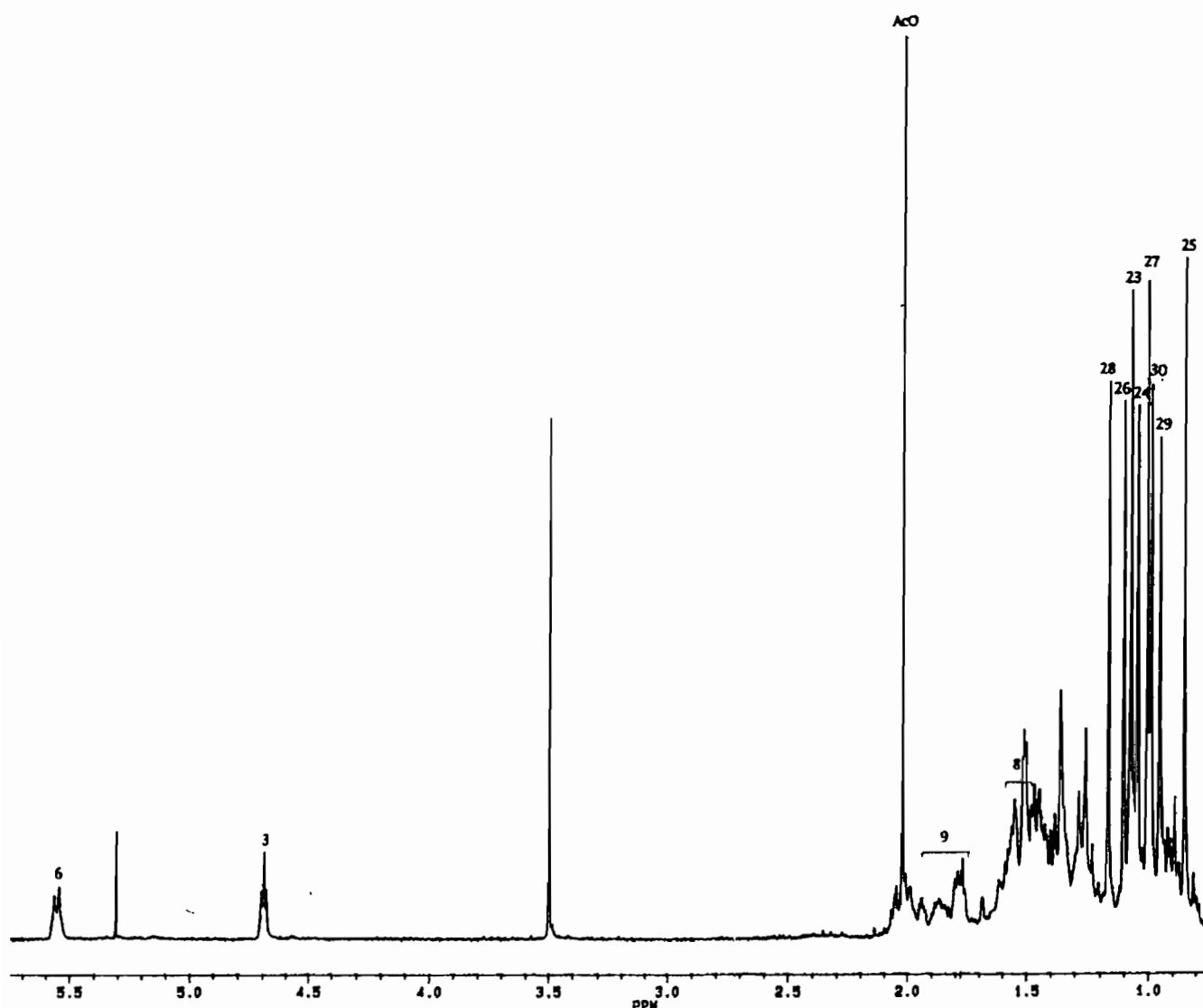


Figure 39. Spectre de RMN 1H du composé **6** (250 MHz)

Un fin triplet pour un proton porté par un carbone oxygéné, est visible à δ 4,70 ppm. Le fort déblindage de ce proton, le place de façon géminée à la fonction acétate. Le dernier signal à δ 5,56 (1H, "dr", $J_{6,5} = 6,0$ Hz, H-6) constitue le méthine d'un système éthylénique.

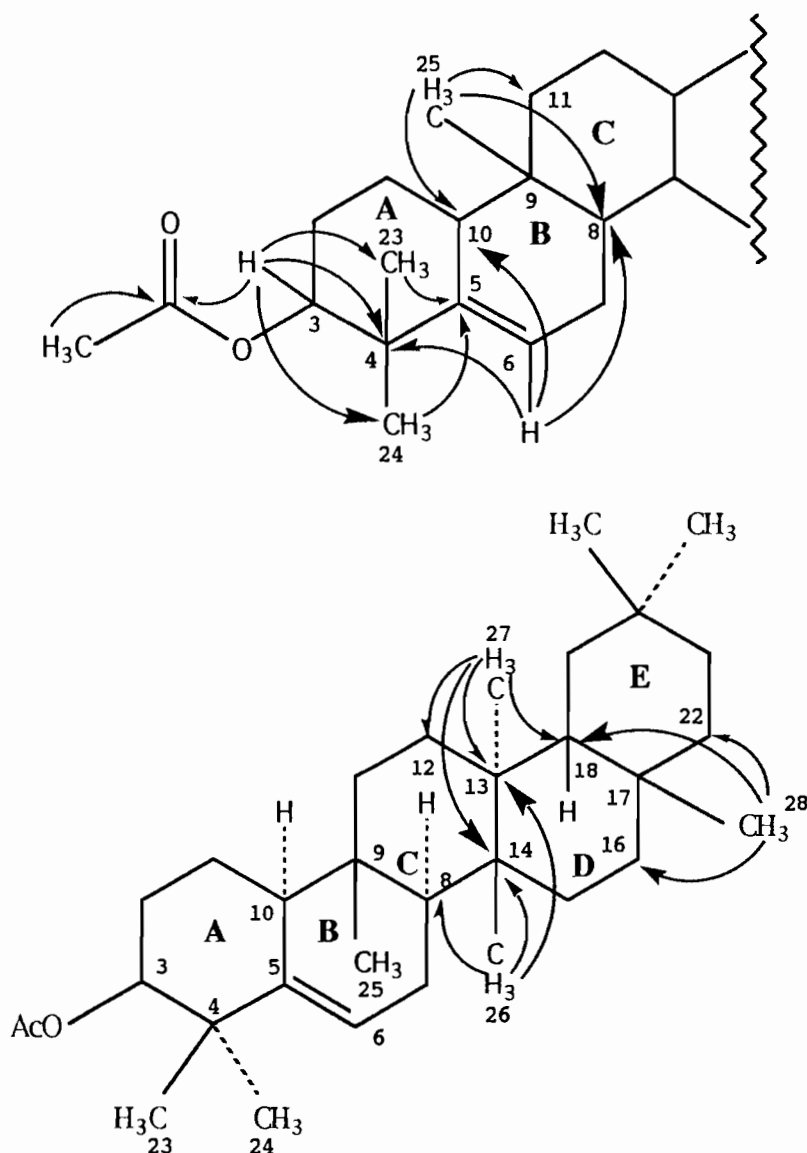
IV.5.2.2. Analyse du spectre RMN ^{13}C

Parmi les trente-deux carbones du spectre de ^{13}C du composé **6**, nous remarquons, grâce aux spectres DEPT 135° et 90°, la présence du carbonyle d'acétate à δ 170,8 et de son méthyle à 21,2 ppm. Le squelette triterpénique comprend une double liaison trisubstituée avec un carbone quaternaire sp^2 à δ 141,9 (s, C-5) et un méthine sp^2 à δ 120,0 (d, C-6), et une fonction alcool secondaire avec un méthine oxygéné à δ 78,6 (d, C-3). Trois méthines en jonction de cycles sont déblindés à δ 49,8 (d, C-10), δ 47,4 (d, C-8) et δ 43,1 (d, C-18). Les huit signaux des méthyles apparaissent à δ 34,5 (C-29), 32,4 (C-30), 32,0 (C-28), 29,1 (C-23), 25,0 (C-24), 21,2 (AcO), 19,5 (C-26), 18,4 (C-27), 16,0 (C-25). Le reste des carbones se répartit en dix méthylènes, et six quaternaires saturés.

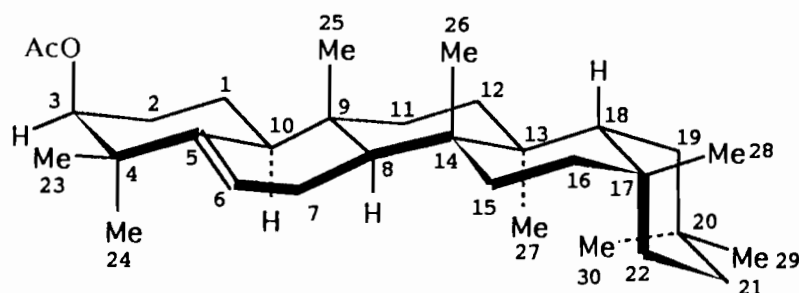
IV.5.2.3. Analyse des spectres COSY, XHCORR et HMBC

La détermination du squelette cyclohydrocarboné de type glutinane du composé **6** a été réalisée à travers l'établissement des corrélations homo- et hétéronucléaires obtenues des expériences COSY, XHCORR et HMBC.

D'après l'expérience XHCORR le proton H-3, δ 4,70 corrèle au C-3 à δ 78,6. Dans le spectre HMBC, H-3 corrèle avec le quaternaire C-4 à δ 39,1 et avec les méthyles C-23 et C-24 (voir Figure 40). On retrouve les corrélations réciproques pour relier H-23 et H-24 avec le C-3. Ces protons méthyliques géminés corréleront avec le carbone quaternaire sp^2 de la double liaison trisubstituée qui est donc le C-5. Le proton éthylénique correspond au H-6 qui montre une corrélation avec le C-5, et trois corrélations $^3J_{\text{HC}}$ avec le C-4 et les deux méthines C-8 et C-10. Ces carbones C-8, C-10 et le méthylène C-11 corréleront avec le méthyle angulaire H-25. Seul le méthine C-8 corrèle avec le méthyle angulaire H-26, ce qui permet de placer ce groupe sur le quaternaire C-14 en jonction des cycles C/D. Les protons H-26 corréleront aux quaternaires C-14 à δ 37,5 et C-13 à δ 39,3 qui présentent des corrélations avec le méthyle H-27. Ce méthyle corrèle au méthine C-18 en jonction des cycles D/E, au méthylène C-12 et au quaternaire C-13. Les méthyles H-29 et H-30 montrent des taches de corrélation identiques du fait de leur position géminée sur le C-20.

Figure 40. *Corrélations du spectre HMBC du composé 6*

Le spectre COSY permet connaître à partir du H-6 éthylénique à δ 5,56 les déplacements chimiques des H-7 et H-7' à δ 1,95 et 1,86. L'analyse de leurs taches de corrélation conduit au H-8 à δ 1,50 (*dd*, $J_{8,7ax} = 9,5$ Hz, $J_{8,7eq} = 3,5$ Hz). Le H-3 à δ 4,70 (*t*, $J_{3,2eq} = J_{3,2ax} = 3,5$ Hz) couple avec les H-2 vicinaux à 1,79 (H-2 axial) et δ 1,50 (H-2 équatorial), et ceux-ci corrélient aux H-1 à δ 0,90. La constante de couplage de H-3 (3,5 Hz) situe ce proton en position équatoriale et permet d'attribuer une configuration β axiale à la fonction acétate (Figure 41). D'après la littérature, cette configuration est la même que celle du glutinol (3-OH β axial), l'autre configuration (3-OH α equatorial) du 3-épiglutinol présenterait une constante de couplage pour H-3 de 12 Hz.¹²⁰

Figure 41. acétate de glut-5-en-3 β -yl 6

Dans le Tableau 41 sont consignées les données de RMN déduites de l'analyse précédente; ces données sont conformes à celles décrites pour l'acétate de glut-5-en-3 β -yl isolé de *Euphorbia maculata*.¹²¹

Tableau 41. Données de RMN du composé 6, à 250 MHz et (^1H) à 69,2 MHz (^{13}C) de l'acétate de glut-5-en-3 β -yl¹²¹

Atome	^1H de 6	réf. 121	^{13}C de 6	réf. 121	Atome	^1H de 6	réf. 121	^{13}C de 6	réf. 121
1	0,90 m		39,0	39,0	15	2,14 m		32,0	32,0
2ax	1,79 m		18,9	18,9		1,90 m			
2eq	1,50 m				16			30,4	30,4
3	4,7 t (3,5)	4,7 t (2,9)	78,6	78,6	17			39,1	39,1
4			39,1	39,1	18	1,59 m		43,1	43,1
5			141,9	141,9	19	1,36 m		35,1	35,1
6	5,56 dl (6)	5,56 dt (5,5, 1,8)	120,0	120,0	20			28,2	28,3
7	1,95 m		23,5	23,5	21	1,32 m		33,1	33,1
	1,86 m				22	1,50 m		36,0	36,0
8	1,50 dt (9,5, 3,5)		47,4	47,4	23	1,08 s	1,07 s	29,1	29,1
9			34,8	34,8	24	1,06 s	1,05 s	25,0	25,0
10	2,01 m		49,8	49,6	25	0,85 s	0,85 s	16,0	16,0
11	1,50 m		34,6	34,6	26	1,10 s	1,10 s	19,5	19,6
12	1,35 m		30,4	30,4	27	1,03 s	1,00 s	18,4	18,4
13			39,3*	39,3*	28	1,16 s	1,16 s	32,0	32,0
14			37,9*	37,9*	29	0,96 s	0,95 s	34,5	34,5
					30	1,01 s	0,99 s	32,4	32,4
					AcO	2,02 s	2,01 s	21,2	21,2
								170,8	170,8

¶ Attributions à partir de l'expérience XHCORR; *Valeurs pouvant être interverties

IV.5.2.4. Analyse du spectre de masse d'impact électronique du composé 6

Le spectre de masse d'IE du composé **6** contient des pics intenses à m/z 274 (100%, $[M]^+ - C_{12}H_{18}O_2$) et 259 (53%, $[M]^+ - C_{12}H_{18}O_2 - Me$) dûs à une fragmentation du type retro-Diels-Alder du cycle B. Ces pics sont caractéristiques d'un squelette triterpénique Δ^5 .^{121,122} La génération d'une charge (+) par l'impact sur la double liaison et la rupture postérieure des liaisons C_9-C_{10} et C_7-C_8 forme le fragment à m/z 194 qui par perte d'acide acétique conduit au fragment à m/z 134 (Schéma 20).

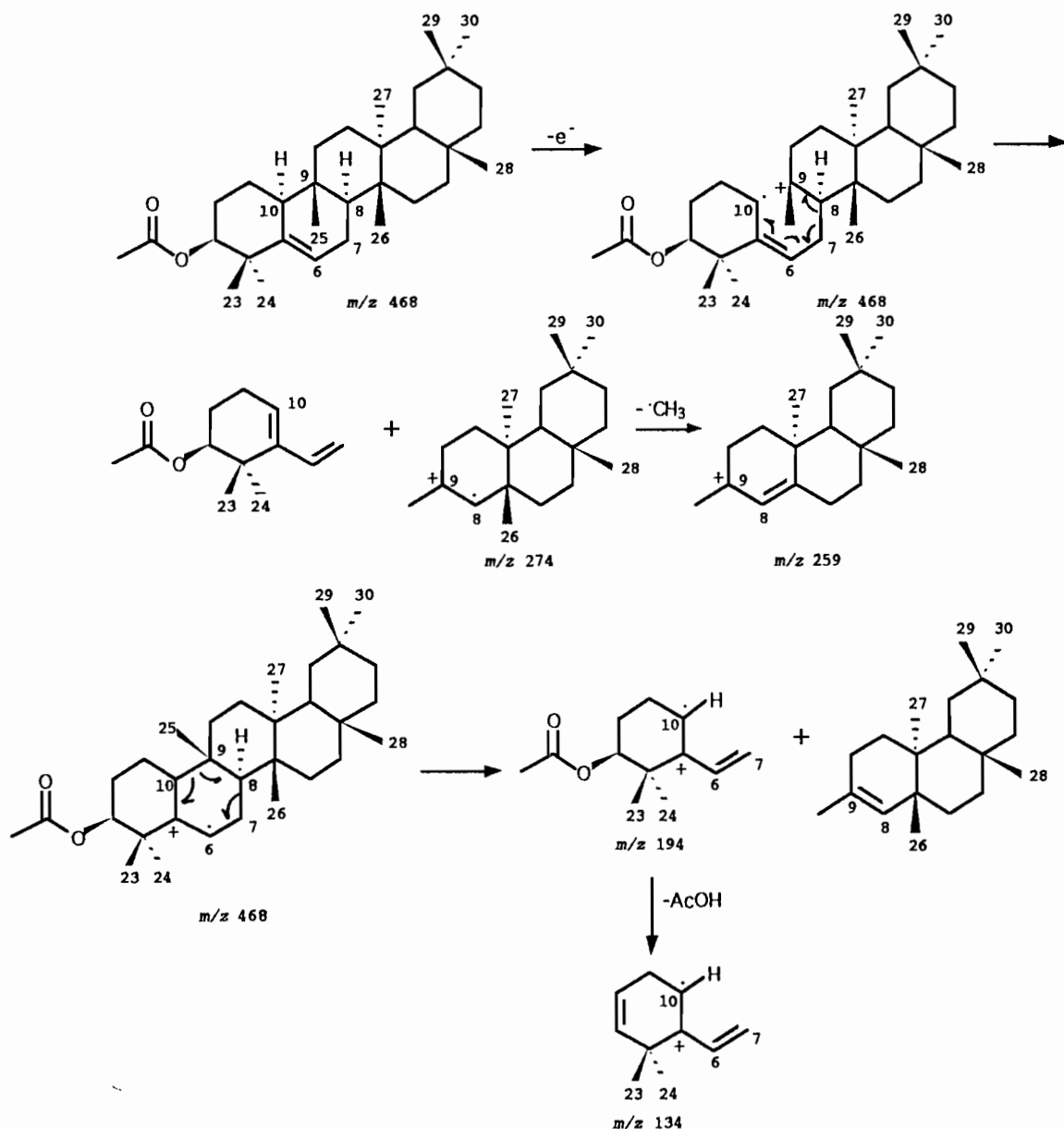
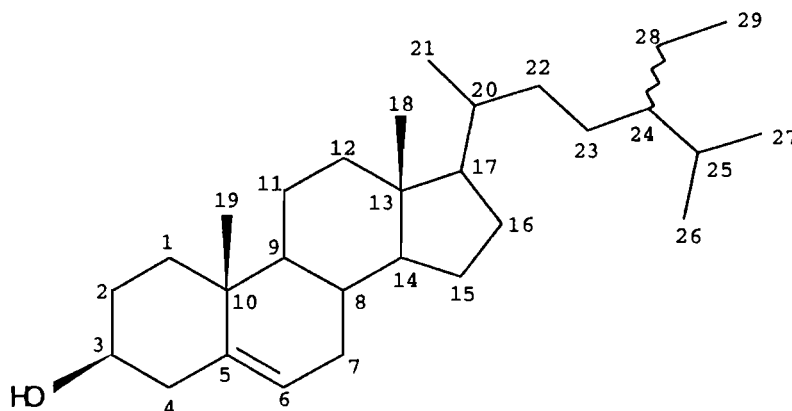


Schéma 20

IV.5.3.Détermination de structure du composé 7

Le troisième composé extrait de *Q. paraensis*, manifestant une activité intéressante contre *P. falciparum*, a été identifié comme le β -sitostérol.



7 β -sitosterol

L'ion moléculaire se situe à m/z 414 ($C_{29}H_{50}O$). Du fait de la présence d'une fonction alcool, la perte d'une molécule d'eau fournit l'ion à m/z 396 ($[M]^+ - H_2O$) suivi de celle d'un méthyle à m/z 381 ($[M]^+ - H_2O - CH_3$). Le pic de base à m/z 274 ($[M]^+ - C_9H_{14}O - H_2$) provient d'une rupture du cycle B par un mécanisme de retro-Diels-Alder comme pour les terpènes Δ^5 .¹²²

Le spectre de RMN 1H présente le proton du système Δ^5 à δ 5,36 (1H, *dl*, $J_{6,7} = 5$ Hz, H-6), le proton d'alcool tertiaire comme un triplet de triplets à δ 3,53 (1H, *tt*, $J_{3,2ax} = J_{3,4ax} = 11$ Hz, $J_{3,2eq} = J_{3,4eq} = 4$ Hz, H-3). En dessous de 1 ppm dans la région des méthyles, plusieurs raies fines apparaissent dont deux singulets correspondant aux deux seuls méthyles angulaires à δ 1,01 (3H, *s*, H-19) et δ 0,69 (3H, *s*, H-18), trois doublets et un triplet pour caractériser les 4 autres méthyles de la chaîne latérale, à savoir, δ 0,94 (3H, *d*, $J_{21,20} = 6,0$ Hz, H-21), δ 0,85 (3H, *t*, $J_{29,28} = 6,0$ Hz, H-29), δ 0,84 (3H, *d*, $J_{26,25} = 6,0$ Hz, H-26) et δ 0,81 (3H, *d*, $J_{27,25} = 6,0$ Hz, H-27).

Le spectre de RMN ^{13}C a été superposé au spectre de RMN ^{13}C du β -sitostérol commercial (SIGMA®), et ne présente aucune différence dans les déplacements chimiques. A l'aide des spectres XHCORR et COSY l'attribution complète des spectres du proton et du carbone a été réalisée (Tableau 42).

Tableau 42. *Données de RMN du composé 7, à 250 MHz (^1H) et 62,9 MHz (^{13}C)*

Atome	^1H	^{13}C	Atome	^1H	^{13}C
1	1,85 <i>m</i>	37,3	15	1,58 <i>m</i>	24,3
	1,10 <i>m</i>			1,08 <i>m</i>	
2	1,85 <i>m</i>	31,7	16	1,86 <i>m</i>	28,2
	1,54 <i>m</i>			1,29 <i>m</i>	
3	3,53 <i>tt</i> (11, 4)	71,8	17	1,09 <i>m</i>	56,1
4	2,27 <i>m</i>	42,3	18	0,69 <i>s</i>	11,9
5		140,8	19	1,01 <i>s</i>	19,4
6	5,36 <i>dl</i> (5)	121,7	20	1,32 <i>s</i>	36,1
7	1,98 <i>m</i>	31,9	21	0,94 <i>d</i> (6)	18,8
	1,53 <i>m</i>		22	1,03 <i>m</i>	34,0
8	1,93 <i>m</i>	31,8		1,30 <i>m</i>	
9	0,95 <i>m</i>	50,1	23	1,15 <i>m</i>	26,1
10		36,5	24	0,93 <i>m</i>	45,9
11	1,48 <i>m</i>	21,1	25	1,68 <i>m</i>	29,2
12	1,99 <i>m</i>	39,8	26	0,84 <i>d</i> (6)	19,8
	1,19 <i>m</i>		27	0,81 <i>d</i> (6)	19,0
13		42,3	28	1,25 <i>m</i>	23,1
14	0,98 <i>m</i>	56,8	29	0,85 <i>t</i> (6)	12,0

¶ Attributions à partir de l'expérience XHCORR directe

IV.6.Détermination de structure des composés de *Dunalia brachyacantha*

Comme cela a été signalé auparavant, les espèces du genre *Dunalia* (Solanaceae) renferment des withanolides. La withaferine A a été isolée auparavant de *D. brachyacantha*.⁸⁹

IV.6.1.Détermination de structure des composés **8** et **9**

Les composés **8** et **9**, sont des withanolides c'est à dire des lactones stéroïdiques à squelette ergostane⁸⁹ possédant une chaîne latérale orientée en β .⁹⁰ Ils ont été identifiés comme étant des dérivés du withanolide D (Figure 42). Ces deux composés sont connus et ont été isolés antérieurement d'*Acnistus arborescens* et d'*Ichroma fuchsioides*.⁹⁷

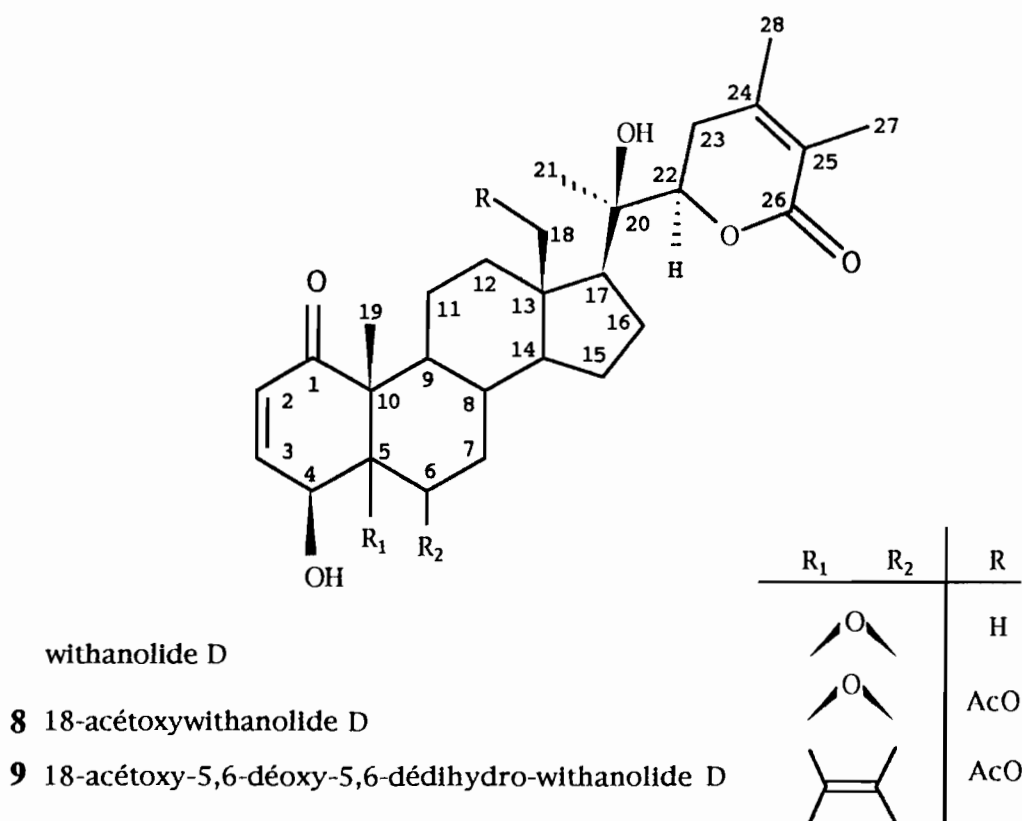


Figure 42

Les composés **8** et **9** montrent des bandes d'absorption en spectrométrie IR suggérant la présence de fonctions esters à 1732 (**8**) et 1737 cm^{-1} (**9**), d'une δ lactone α,β -insaturée à 1709 (**8**) et 1705 cm^{-1} (**9**) et d'une cétone α,β -insaturée à 1689 (**8**) et 1694 cm^{-1} (**9**). L'absorption maximale en UV à 242 nm permet de confirmer les chromophores cétoniques α,β -insaturés (**8** et **9**).

IV.6.1.1. Analyse des spectres de RMN

Le composé **8**, présente dans son spectre de RMN proton (Figure 43, Tableau 43) des signaux avec des déplacements chimiques et multiplicités similaires à ceux attendus ou décrits dans la littérature pour le withanolide D.^{83,84}

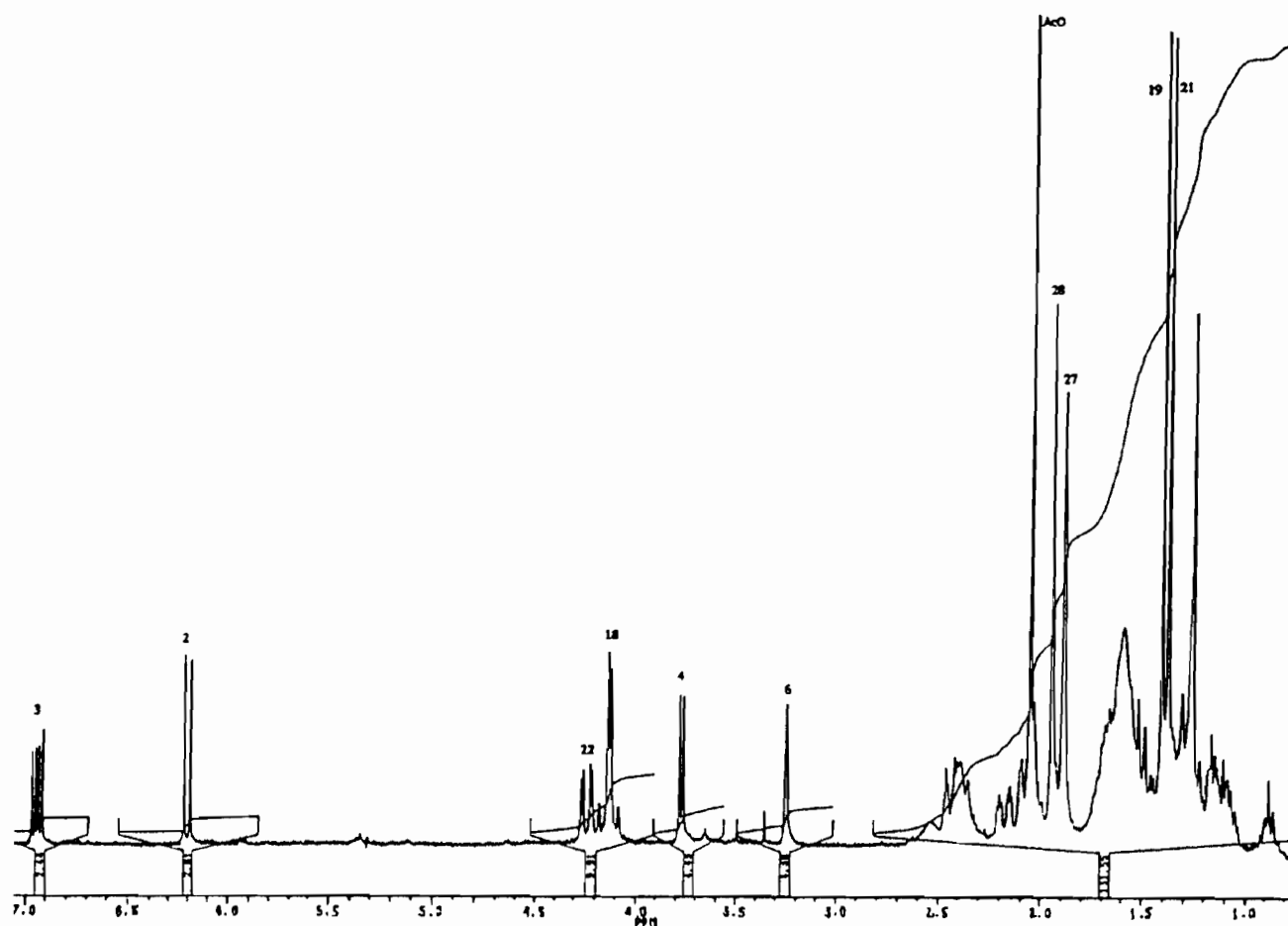


Figure 43. Spectre de RMN ^1H du composé **8** (300 Mhz)

On distingue ainsi:

- le système de spin éthylénique AMX du cycle A, à δ 6,94 (1H, *dd*, $J_{3,2} = 10,0$ Hz, $J_{3,4} = 5,8$ Hz, H-3), δ 6,20 (1H, *d*, $J_{2,3} = 10,0$ Hz, H-2) et δ 3,77 (1H, *d*, $J_{4,3} = 5,8$ Hz, H-4),
- le proton époxydique à δ 3,25 (1H, *sl*, H-6),
- le proton du méthine de la δ lactone α,β -insaturée à δ 4,25 (1H, *dd*, $J_{22,23\text{ax}} = 13,3$ Hz, $J_{22,23\text{eq}} = 3,6$ Hz, H-22),

-deux singulets déblindés pour des méthyles quaternaires portés par des carbones éthyléniques à δ 1,89 (3H, *s*, H-27) et δ 1,95 (3H, *s*, H-28),

-deux autres méthyles quaternaires à δ 1,40 (3H, *s*, H-19) et δ 1,38 (3H, *s*, H-21).

L'absence d'un troisième méthyle angulaire (H-18), et la présence d'un acétate (δ 2,05 ppm, 3H, *s*) estérifiant un alcool primaire isolé avec ses deux protons CH₂OAc formant un système AB déblindés à δ 4,15 (1H, *d*, $J_{18,18'} = 11,6$ Hz, H-18) et δ 4,11 (1H, *d*, $J_{18',18} = 11,5$ Hz, H-18') suggère que l'un des méthyles du withanolide D a été oxydé en CH₂OR.

L'analyse du spectre COSY H-H permet de mettre en évidence l'enchaînement vinylique hydroxylé du cycle A par les corrélations H-2/H-3 et H-3/H-4. Le proton H-6 de l'époxyde corrèle à deux protons blindés les H-7 à 2,18 (1H, *dt*, $J = 15,2$ Hz, $J = 3,0$ Hz, H-7e) et 1,25 ppm (H-7a). De façon analogue, le proton de la lactone H-22 corrèle aux H-23 à 2,08 et 2,40 ppm.

Le spectre de RMN ¹³C JMOD (Tableau 44) confirme cette hypothèse par la présence de seulement quatre méthyles à δ 12,3 (C-27), δ 17,6 (C-19), δ 20,5 (C-28) et δ 21,2 (C-21), plus celle d'un méthyle d'acétate à δ 20,4. Les six méthylènes du withanolide D sont retrouvés à δ 21,8 (C-16), δ 22,1 (C-11), δ 23,6 (C-15), δ 31,3 (C-23), δ 31,5 (C-7) et δ 34,9 (C-12). Un méthylène supplémentaire et oxygéné apparaît à δ 61,7 (*t*, C-18). Les méthines *sp*³ se situent à δ 29,6 (C-8), δ 44,2 (C-9), δ 54,9 (C-17) et δ 56,2 (C-14); ceux oxygénés à δ 62,5 (*d*, C-6) et δ 69,8 (C-4), et celui de la lactone à δ 80,0 (C-22). Les deux méthines *sp*² conjugués à la cétone résonnent à δ 132,1 (C-2), δ 142,0 (C-3). Les carbones quaternaires se dénombrent en:

-deux *sp*³, à δ 45,2 (C-13) et δ 48,0 (C-10),

-deux *sp*³ oxygénés à δ 63,8 (C-5) et δ 74,7 (C-20) et

-deux *sp*² à δ 122,0 (C-25) et δ 149,0 (C-24).

Les trois carbonyles ne sont pas visibles dans le spectre ¹³C J modulé. Ils seront attribués d'après les corrélations ²*J*_{C-H} et ³*J*_{C-H} qu'ils possèdent dans le spectre HMBC. Ces trois fonctions carbonylées sont ainsi attribuées: une lactone à δ 166,0 (C-26), un acétate à δ 171,0 et une cétone α,β -insaturée à δ 202,3 (C-1).

L'expérience de RMN 2D HMBC permet d'établir le squelette de base cyclohydrocarboné du withanolide D. A partir du seul méthyle angulaire H-19, les différents atomes protons et carbones

composant les cycles A et B seront attribués. Ensuite, de la même façon l'analyse des corrélations observées à partir du CH₃-21, CH₃-27 et CH₃-28 permet d'attribuer la chaîne latérale qui inclut le cycle lactonique à six chaînons.

Le méthyle angulaire H-19 présente quatre taches de corrélation avec les quaternaires de jonction de cycle C-10 et C-5, le méthine C-9 et avec la cétone C-1. Cette cétone (C-1) se trouve liée au groupe alcène C₂=C₃, du fait de sa corrélation avec H-3, et par la corrélation entre H-2 et C-10. Ceci permet d'installer la fonction cétone α,β -insaturée dans le cycle A. L'analyse de corrélations est poursuivie avec la corrélation $^3J_{CH}$ entre H-3 et C-5 de l'époxyde. Ce dernier corrèle aussi avec le proton H-4 geminé à l'alcool, qui présente lui même des corrélations avec les C-2 et C-3 et avec le carbone du cycle oxirane C-6. Le proton époxydique H-6 corrèle avec le méthylène C-7 et le méthine C-8. La Figure 44 montre l'arrangement des éléments composant les cycles A et B et les principales corrélations $^2J_{CH}$ et $^3J_{CH}$ relevées sur le spectre HMBC.

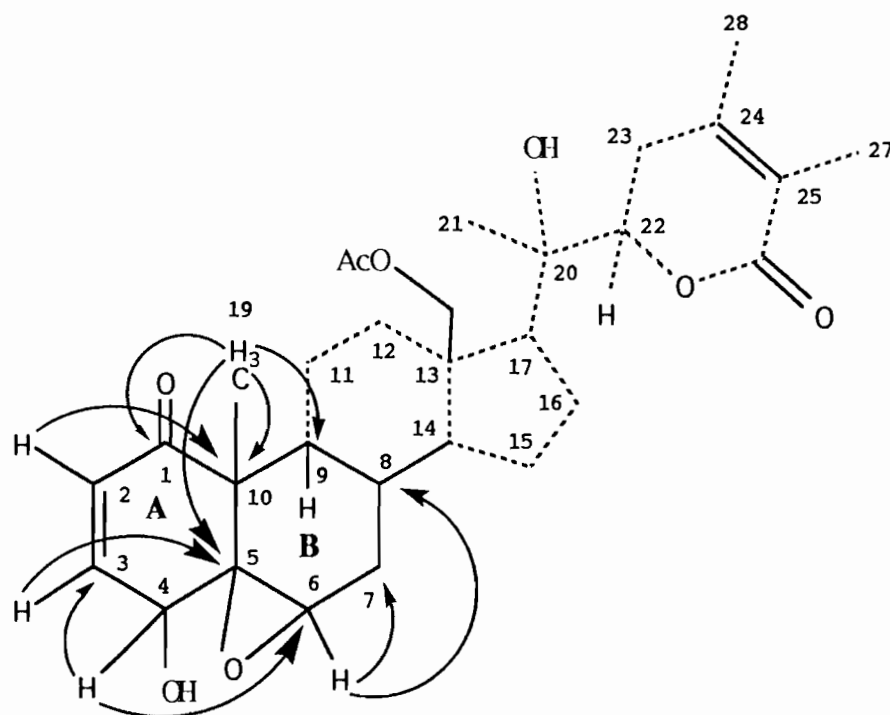


Figure 44. Corrélations dans la carte HMBC du composé **8**, cycles A et B

La Figure 45 montre les corrélations qui permettent d'établir une structure δ -lactone α,β -insaturée dans le composé **8**. Les méthyles H-28 et H-27 par leurs corrélations communes avec C-25 et C-24, et celles respectives avec le méthylène C-23 et le carbonyle lactonique C-26 conduisent à la proposition du cycle lactonique à six membres. Le déblindage de H-22 (δ 4,24) correspond à un proton geminé à une lactone. La corrélation lactonique $^3J_{HC}$ attendue entre H-22 et C-26 est inexistante. Cette lactone

est liée au C-20 comme l'indique la corrélation $^2J_{CH}$ entre H-22 et C-20. Ce dernier porte le CH₃-21 prouvé par la corrélation H-21→C-20, et une fonction alcool tertiaire du fait de son déblindage à 74,7 ppm. L'attachement de la chaîne latérale sur le C-17 du squelette cyclopentanoperhydrophénanthrène du withanolide D est confirmé par le couplage $^3J_{CH}$ entre H-21/C-17.

L'ensemble de l'analyse du spectre HMBC confirme la présence d'une sous-structure withanolide D dans le composé 8. L'acétate du composé 8 est positionné sur le C-18. Les protons méthyléniques H-18 corrélient au méthine C-17 porteur de la chaîne latérale, au carbone quaternaire C-13 et au méthylène C-12 du withanolide D. Le dernier carbonyle, celui de l'acétate montre une corrélation $^3J_{CH}$ avec les deux protons H-18. Le composé 8 est donc le dérivé 18-acétoxywithanolide D.

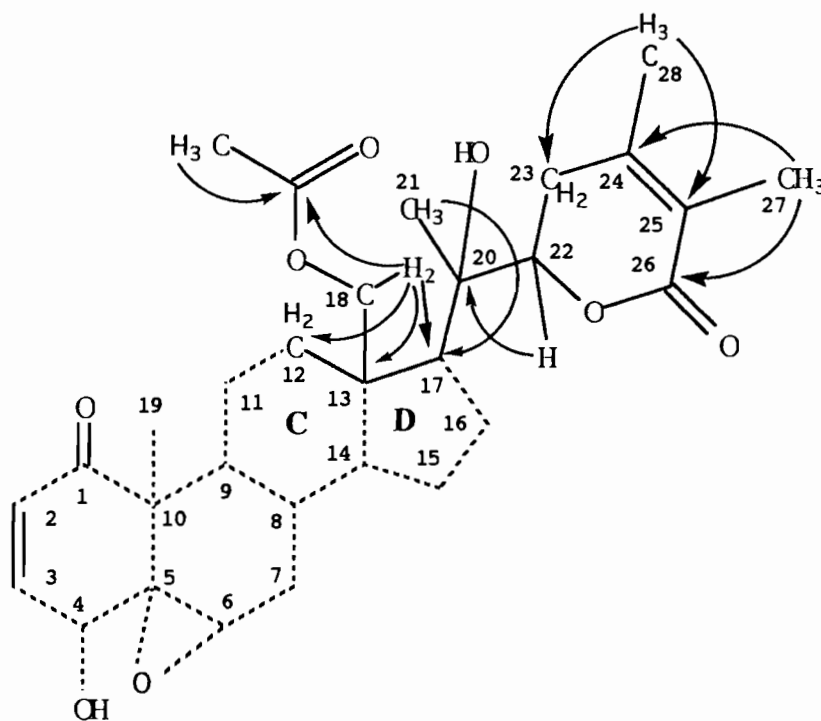


Figure 45. *Corrélations dans la carte HMBC du composé 8, cycles C et D, et chaîne latérale*

La stéréochimie relative de certains centres asymétriques du composé 8 a été vérifiée à l'aide de la mesure d'effet Overhauser. L'expérience bidimensionnelle ROESY (Figure 46) montre quelques effets significatifs.

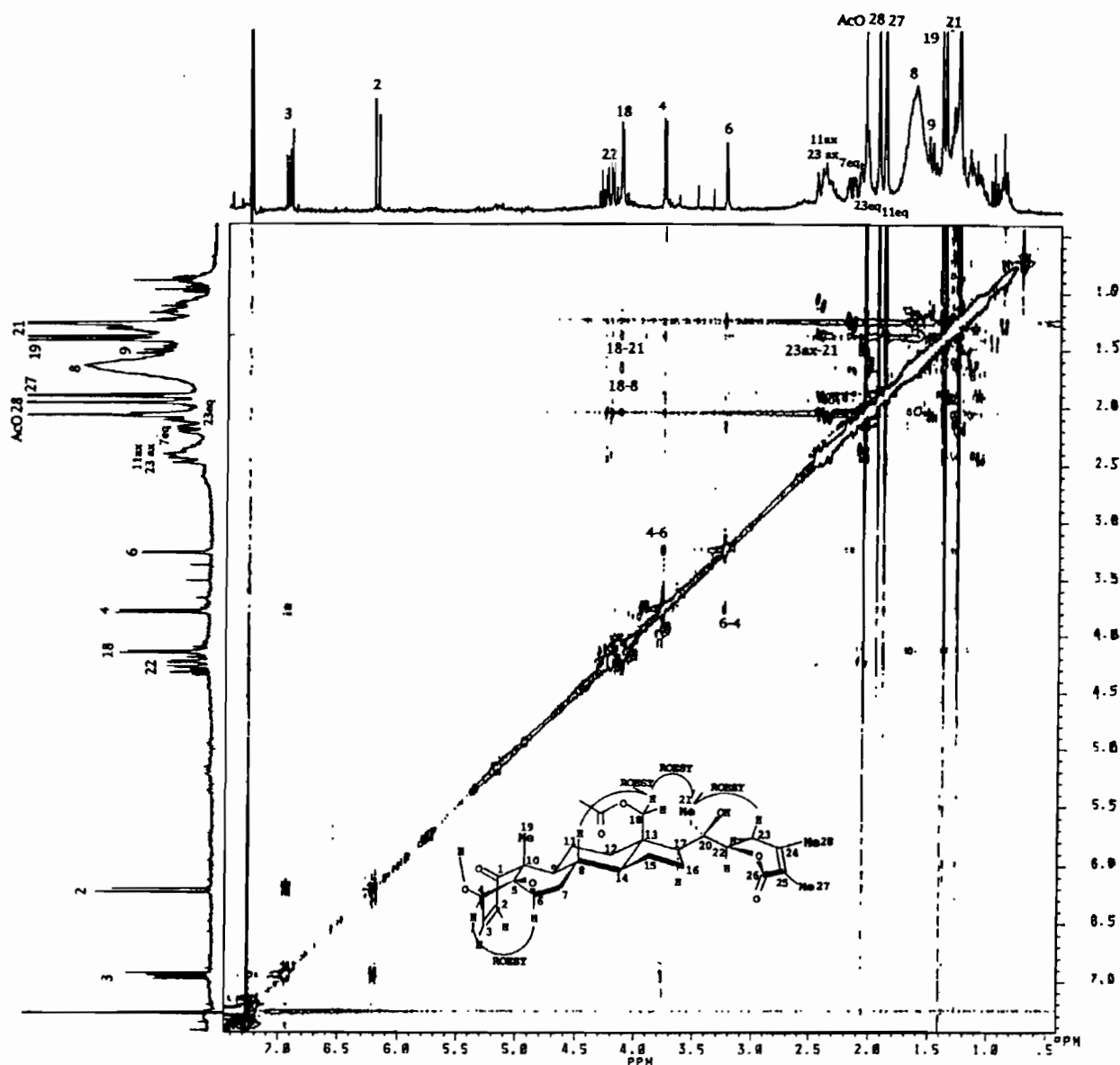


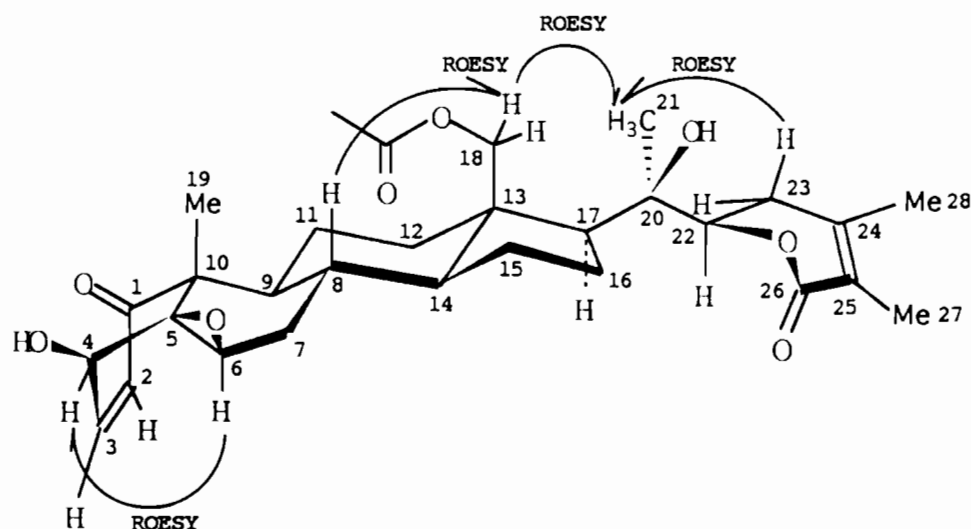
Figure 46. Spectre ROESY du composé 8

L'observation d'un effet nOe entre H-4 et H-6, se justifie en positionnant H-4 et H-6 du même côté du plan de la molécule c'est à dire que les deux protons adoptent la position α , en mettant H-4 en position équatoriale et H-6 en position axiale. Cette conclusion permet de placer le groupe 4-OH et l'oxygène de l'oxirane en position β , d'où une forme bateau pour le cycle A. La valeur de la constante de couplage $J_{4,3} = 5,8$ Hz est très proche de celle de 6,0 Hz rapportée pour le withanolide D.⁸⁴ Le déplacement chimique de H-4 à 3,77 ppm est identique dans le composé 8 et dans le withanolide D.

Les méthyles angulaires H-19 et H-18, sont définis d'après la biogenèse des withastéroïdes comme étant en position β axiale. Tous ces éléments permettent d'établir une jonction *cis* des cycles A et B.

La configuration absolue du C-20 a été définie comme étant 20*R* avec une configuration β du 20-OH. La justification fait suite à une analyse comparée des valeurs de δ du H-21 dans **8** avec celle du H-21 dans les hydroxy-20 cholestérol. Le cholestérol possède son CH₃-21 à δ 0,90 ppm. l'introduction d'un hydroxyle sur le C-20, engendre un déblindage de H-21 de $\Delta = +0,30$ ppm pour une configuration 20 β -OH, et de $\Delta = +0,13$ ppm pour l'isomère 20 α -OH.¹²³ En appliquant ce calcul à notre composé **8**, nous constatons une différence de $\Delta\delta = +0,48$ ppm pour H-21, ce qui est en faveur d'une orientation α du H-21 (20 β -OH). Tous les withanolides naturels sauf le physangulide possèdent une configuration 22*R*.⁸⁹ L'observation d'un effet Cotton positif avec un maximum d'absorption à λ 240 nm, est aussi indicatif de la configuration 22*R* pour le composé **8**. La chaîne latérale est fixée sur le C-17 en orientation β , selon la valeur caractéristique de δ 74,7 ppm du C-20; au contraire une chaîne fixée en α se manifeste par un déplacement chimique plus élevé: 77,5 (acétate de physalolactone C),⁸⁹ 78,8 (withapéruvine),⁸⁹ 79,6, 78,3, 79,1 (withapéruvine C, D et H)⁸⁹ et 79,2 ppm (5 α -éthoxy-6 β ,14 α ,17 β ,20 α -tetrahydroxy-1-oxo-20*S*,22*R*-witha-2,24-diénoïde).¹²⁴ L'effet ROE observé entre le CH₃-21 et le méthylène acétylé CH₂-18 β , confirme la position β de la chaîne. Un second effet ROE est observé entre les protons H-18 et le proton H-8 indiquant sa position β -axiale.

L'analyse précédente définit le composé **8** comme le (20*R*,22*R*)-18-acétoxy-5,6 β -époxy-4 β ,20-dihydroxy-witha-2,24-diénoïde. La comparaison des données de RMN ¹³C de **8** avec celles décrites dans la littérature pour le 18-acétoxywithanolide D⁹⁷ confirme son identité.



Le second withanolide isolé, le composé **9**, présente un spectre de RMN ^1H (Figure 47, Tableau 43) très similaire à celui de **8**, où on retrouve dans la partie déblindée: le système de couplage AMX du cycle A, δ 6,79 (1H, *dd*, $J_{3,2} = 10,5$ Hz, $J_{3,4} = 4,5$ Hz, H-3), δ 5,95 (1H, *d*, $J_{2,3} = 10,3$ Hz, H-2) et δ 4,63 (1H, *d*, $J_{4,3} = 4,5$ Hz, H-4), le proton du méthine de la δ lactone α,β -insaturée à δ 4,25 (1H, *dd*, $J_{22,23\text{ax}} = 13,3$ Hz, $J_{22,23\text{eq}} = 3,6$ Hz, H-22), les deux doublets qui intègrent pour deux protons geminés d'un méthylène oxygené à δ 4,21 (1H, *d*, $J_{18,18'} = 11,8$ Hz, H-18) et δ 4,16 (1H, *d*, $J_{18',18} = 11,6$ Hz, H-18'). Le dernier proton H-6 est déblindé à 5,92 ppm (1H, *d*, $J_{6,7\text{eq}} = 4,6$ Hz) dans la zone des protons éthyléniques. Les autres signaux entre 1 et 2,7 ppm sont grossièrement aux mêmes déplacements chimiques dans les deux withanolides **8** et **9**. Par rapport au composé **8** le déblindage du H-4 (de δ 3,77 dans **8** à 4,63 dans **9**) et celui du H-6 (de δ 3,25 dans **8** à 5,92 dans **9**), indique la présence d'une double liaison Δ^5 au lieu de l'époxyde 5,6. Fait confirmé d'après le spectre de masse d'impact électronique qui présente un ion moléculaire pour le composé **9** avec un déficit de seize unités de masse atomique par rapport à celui de **8**.

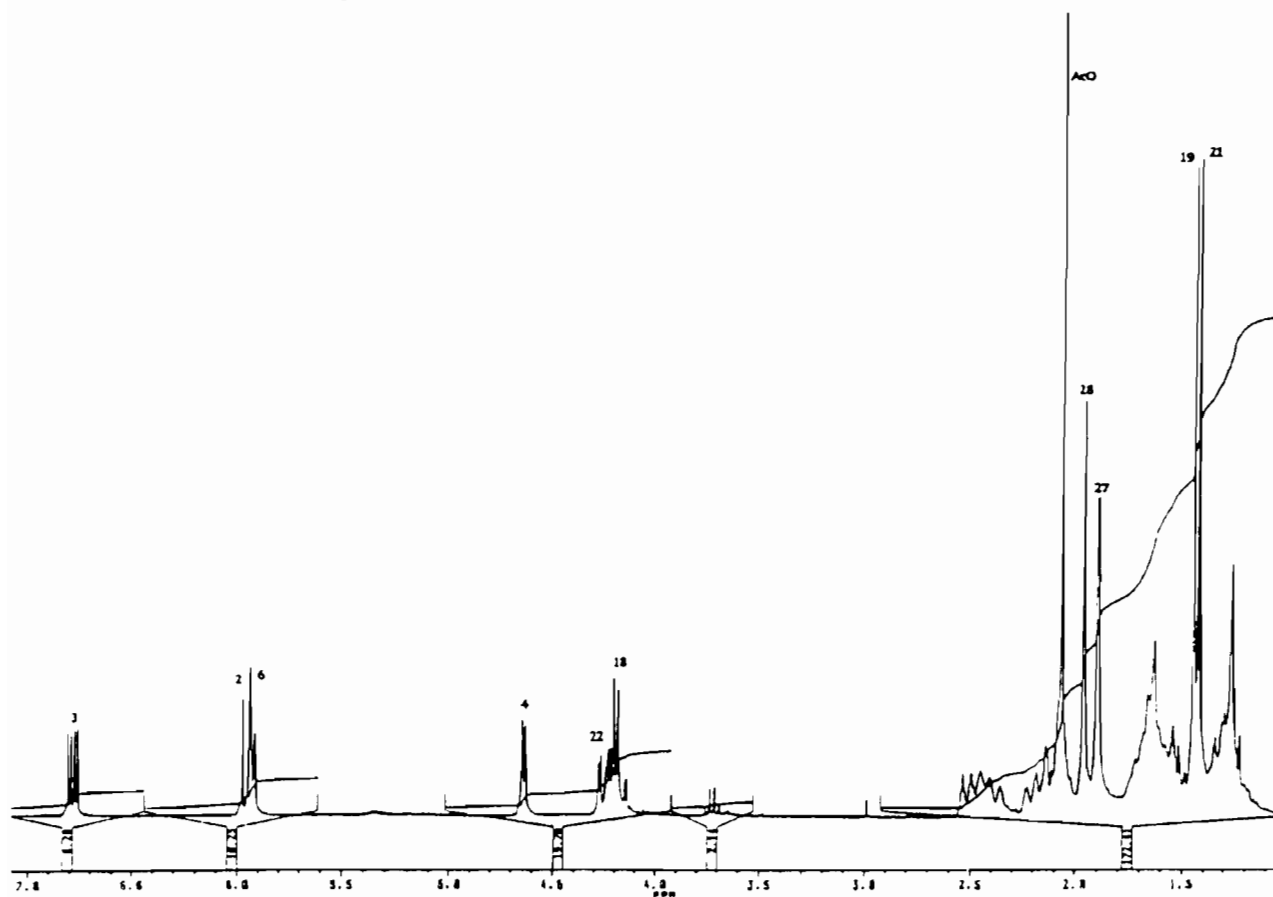
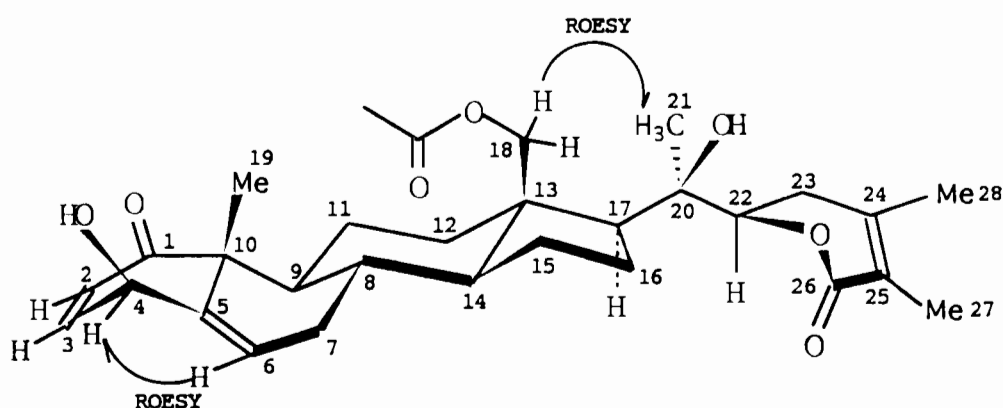


Figure 47. Spectre de RMN ^1H du composé **9** (300 MHz)

Le spectre de RMN ^{13}C JMOD (Tableau 44) du composé **9** est très proche aussi de celui de **8**. Les signaux des carbones quaternaires oxygénés à δ 63,8 (C-5) et δ 62,5 (C-6) de l'oxirane du composé **8** se retrouvent déplacés à δ 139,0 (C-5) et δ 130,5 (C-6), pour une double liaison $\text{C}_5\text{-C}_6$ dans le composé **9**. On constate aussi des différences importantes entre les déplacements chimiques des carbones voisins de la liaison $\text{C}_5\text{-C}_6$. Ainsi les C-1, C-2, C-8, C-9, C-10 et C-19 montrent des différences de Δ 1,2 ppm pour le C-1 à Δ 5,2 ppm pour le CH_3 -19. Les C-1, C-8, C-10, et C-19 dans le composé **9** se trouvent déblindés, tandis que les C-2 et C-9 apparaissent plus blindés.

Le composé **9**, est donc le 18-acétoxy-5,6-déoxy-5,6-déhydro-withanolide D. L'attribution de son spectre de RMN ^{13}C a été étayée comme dans le cas du 18-acétoxywithanolide D **8**, par l'analyse combinée des spectres de corrélation hétéronucléaire HMQC et HMBC. Les valeurs relevées sont identiques à celles décrites dans la littérature.⁹⁷

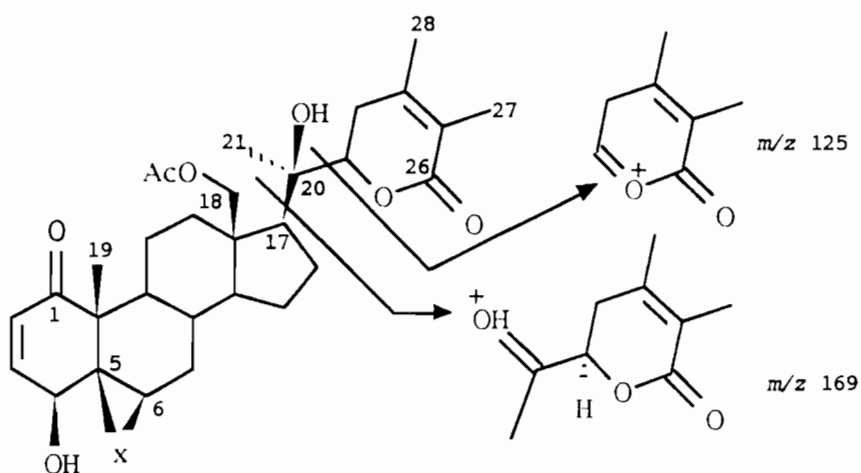
La stéréochimie du composé **9** a été vérifiée de la même manière que pour le composé **8**. Un effet vectoriel entre H-4 et H-6 dans le spectre ROESY permet de placer H-4 en α et 4-OH en β . La configuration absolue 20*R* a été définie comme pour **8** en comparant la différence de δ du H-21 (1,42 ppm) à celui du cholestérol¹²³ (0,90 ppm), une valeur de $\Delta\delta = +0,52$ ppm est plus proche de celle rapportée pour le 20 β -OH-cholestérol (20*R*) que pour le 20 α -OH-cholestérol (20*S*). La configuration 22*R* de la lactone est déterminée d'après l'observation d'un effet Cotton positif à 240 nm de la courbe de DC. L'orientation β de la chaîne latérale sur le C-17 est déduite du déplacement chimique du C-20 (74,8 ppm) typique d'une orientation β pour la chaîne latérale des withanolides. Un effet ROE entre H-18 et CH_3 -21 dans l'expérience ROESY confirme cette orientation.



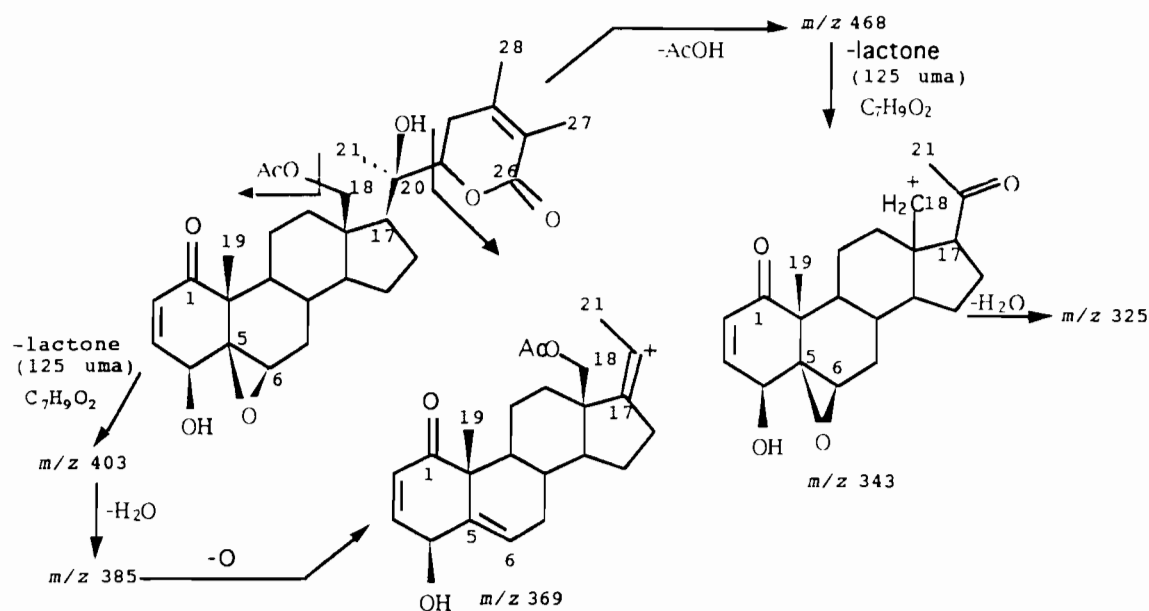
L'analyse précédente, permet d'identifier le composé **9** comme le (20*R*,22*R*)-18-acétoxy-4 β ,20-dihydroxy-witha-2,5,24-trienolide. Quelques changements (Tableau 43) dans les attributions de RMN ^1H rapportées dans la littérature⁹⁷ pour **8** et **9**, sont justifiés suite à l'analyse réalisée sur des spectres 2D (COSY, HMBC et HMQC).

IV.6.1.2. Analyse des spectres de masse

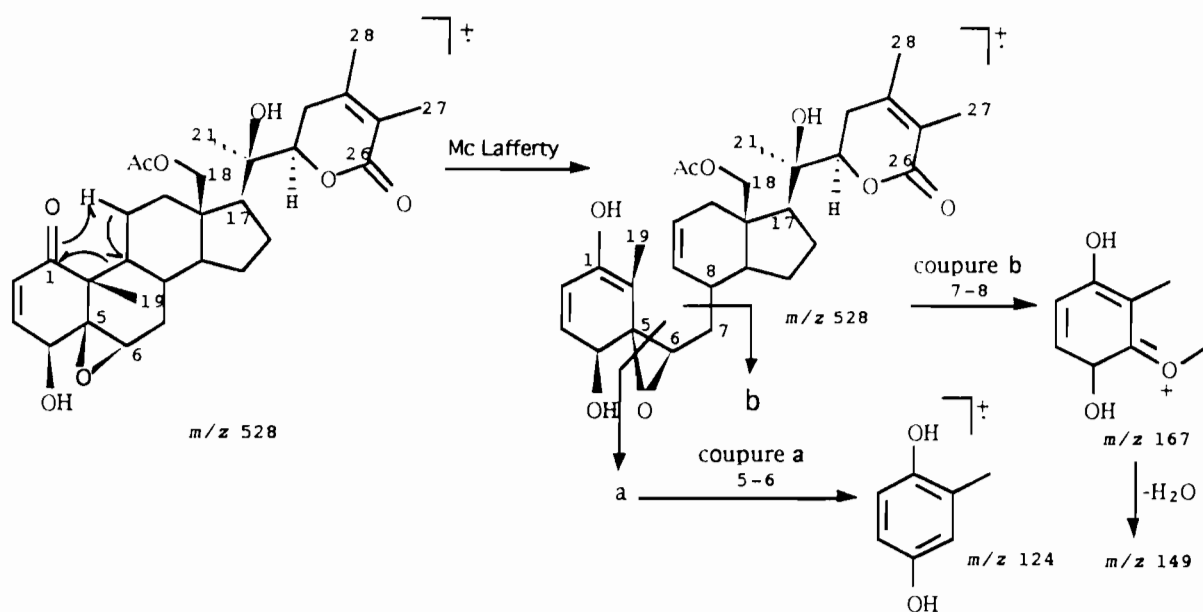
Dans le spectre de masse sous impact électronique de **8** (Figure 48), le pic moléculaire n'est pas détecté (attendu à m/z 528 pour $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_8$). Le spectre de masse IE du composé **9** (Figure 49), présente son ion moléculaire attendu à m/z 512 (analysé pour $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_7$). Des ions générés par la perte de $[\text{M}]^+$ de H_2O et de HOAc , à m/z 494 et 452 accompagnent l'ion moléculaire. La perte de la lactone par rupture de la liaison 20-22 conduit aux fragments peu intenses à m/z 403 pour **8** et m/z 387 pour **9**. Cette fragmentation engendre un ion intense à m/z 125 caractéristique des δ lactones stéroïdiques insaturées, accompagné de celui à m/z 169 pour la chaîne latérale (coupure 17-20); ces deux fragments sont repérables dans les spectres de **8** et **9**.⁹⁷



Pour le composé **8**, six ions principaux supplémentaires sont détectés à m/z 369, 343 (100%), 325, 215, 149 et 124. Les trois premiers proviennent de la perte de la lactone selon les fragmentations suivantes:



La rupture du cycle B initiée par un réarrangement de Mac Lafferty, conduit à un ion qui se fragmente pour donner l'ion à m/z 149 par coupure de la liaison C₇-C₈, réarrangement de l'époxyde et déshydratation, et l'ion à m/z 124 par coupure de la liaison C₅-C₆.



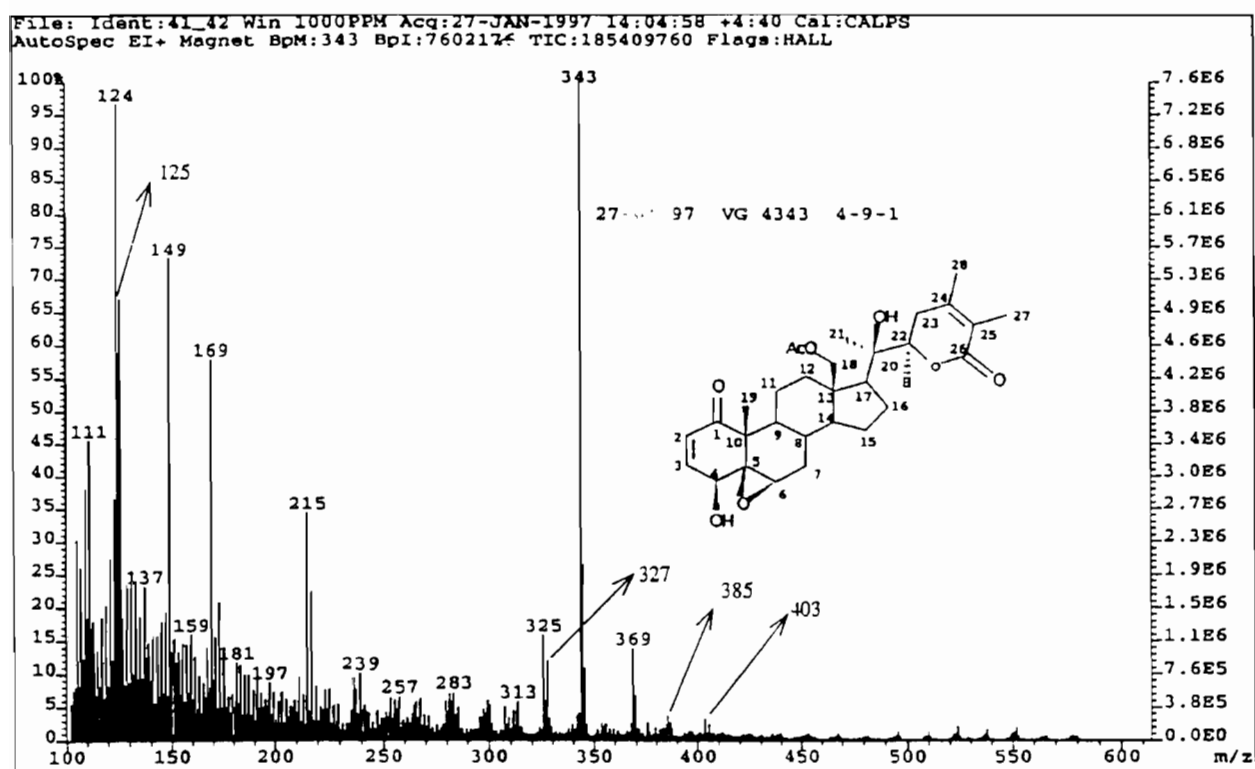


Figure 48. Spectre de masse sous impact électronique du composé 8

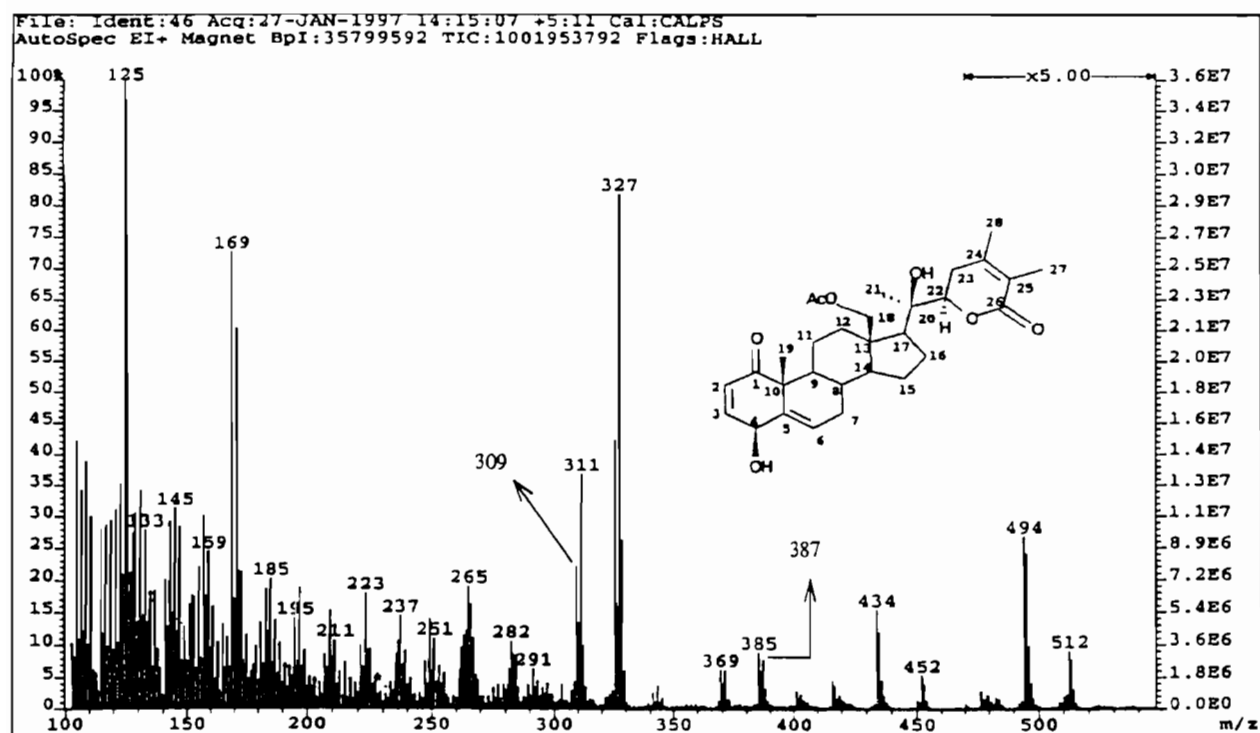
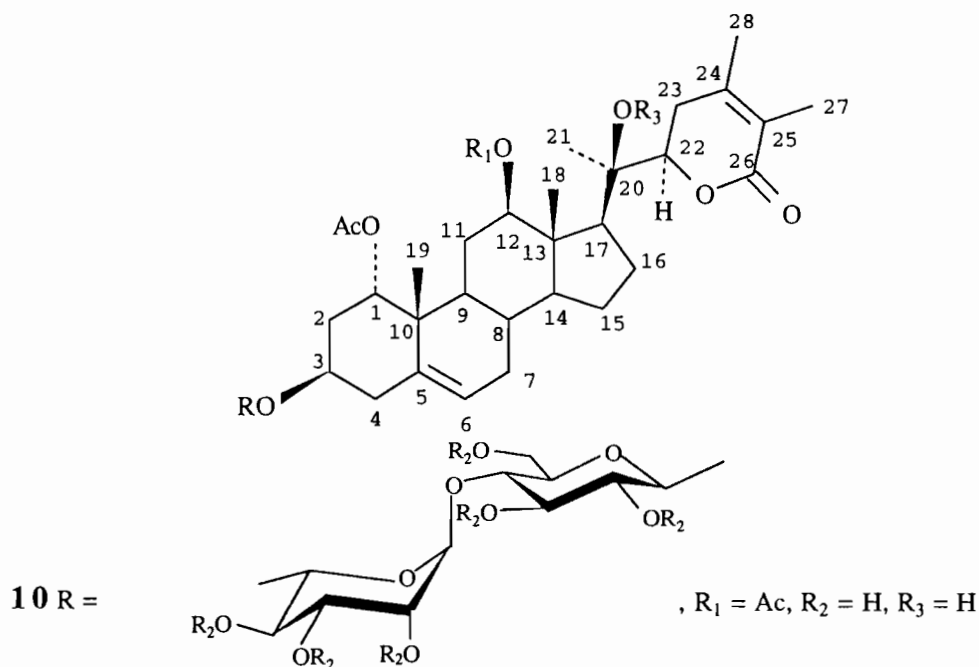


Figure 49. Spectre de masse sous impact électronique du composé 9

Le spectre de masse du composé **9** (Figure 49), présente les mêmes mécanismes de fragmentations fondamentales que celui de **8**, à savoir, la séparation du cycle lactone, la déacétylation et la déshydratation. La découverte de 18-acétoxy withanolides dans *D. brachyacantha*, augmente à deux le nombre des espèces de Solanaceae qui contiennent ce type de produits; *Lochroma fuchsioides*,⁹⁷ est la seule espèce à part *D. brachyacantha* qui contient les withanolides **8** et **9**.

IV.6.2.Détermination de structure des composés **10** et **11**

Un withanolide diglycosylé et un withanolide triglycosylé ont été trouvés dans les feuilles et dans les racines respectivement de *D. brachyacantha*. L'analyse structurale a montré que la génine de ces composés ne correspond pas à un des withanolides déjà isolés de cette espèce (composés **8**, **9** et withaferine A).

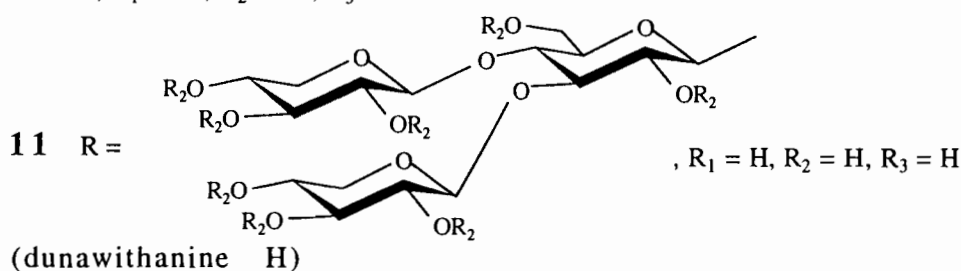


(dunawithanine G)

10a $R, R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{Ac}$, $R_3 = \text{H}$

10b $R = \text{H}$, $R_1 = \text{Ac}$, $R_3 = \text{H}$, (génine)

10c $R, R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{Ac}$, $R_3 = \text{Ac}$



11a $R, R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{Ac}$, $R_3 = \text{H}$

11b $R = \text{H}$, $R_1 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$, (génine)

11c $R, R_1 = \text{Ac}$, $R_2 = \text{Ac}$, $R_3 = \text{Ac}$

Des absorptions en infrarouge à 1692 , 1734 cm^{-1} (**10**) et à 1658 cm^{-1} (**11**) sont indicatives de la présence de carbonyles d'acétate; celles à 1714 cm^{-1} (**10**) et à 1712 cm^{-1} (**11**) sont caractéristiques de

la fonction lactone α,β -insaturée. Les maxima d'absorption en spectroscopie UV, se situent à 206 nm (**10**) et à 208 nm (**11**).

En RMN ^1H , apparaissent deux zones:

-celle entre 0,5 et 3,0 ppm où apparaissent des nombreux multiplets et cinq fins singulets caractéristiques du squelette stéroïdique des withanolides,

-entre 3,0 et 5,0 ppm, une zone de protons osidiques caractéristiques de la présence de plusieurs unités d'une structure hétérosidique.

IV.6.2.1. Structure de la génine de **10** et **11**

Les composés **10** et **11** renferment la même aglycone stéroïdique, la 1α -acétoxy- $3\beta,12\beta,20$ -trihydroxy-witha-5,24-diénoïde ou 12β -hydroxyphysalolactone B.⁸¹ Cette génine est naturellement acétylée en position 12 dans le composé **10** et correspond à la 12β -acétoxyphysalolactone B, qui constitue une nouvelle génine. Le spectre RMN ^1H (Figure 50, Tableau 43), de la partie aglycone du composé **10** présente à basses fréquences des signaux pour six groupes méthyles.

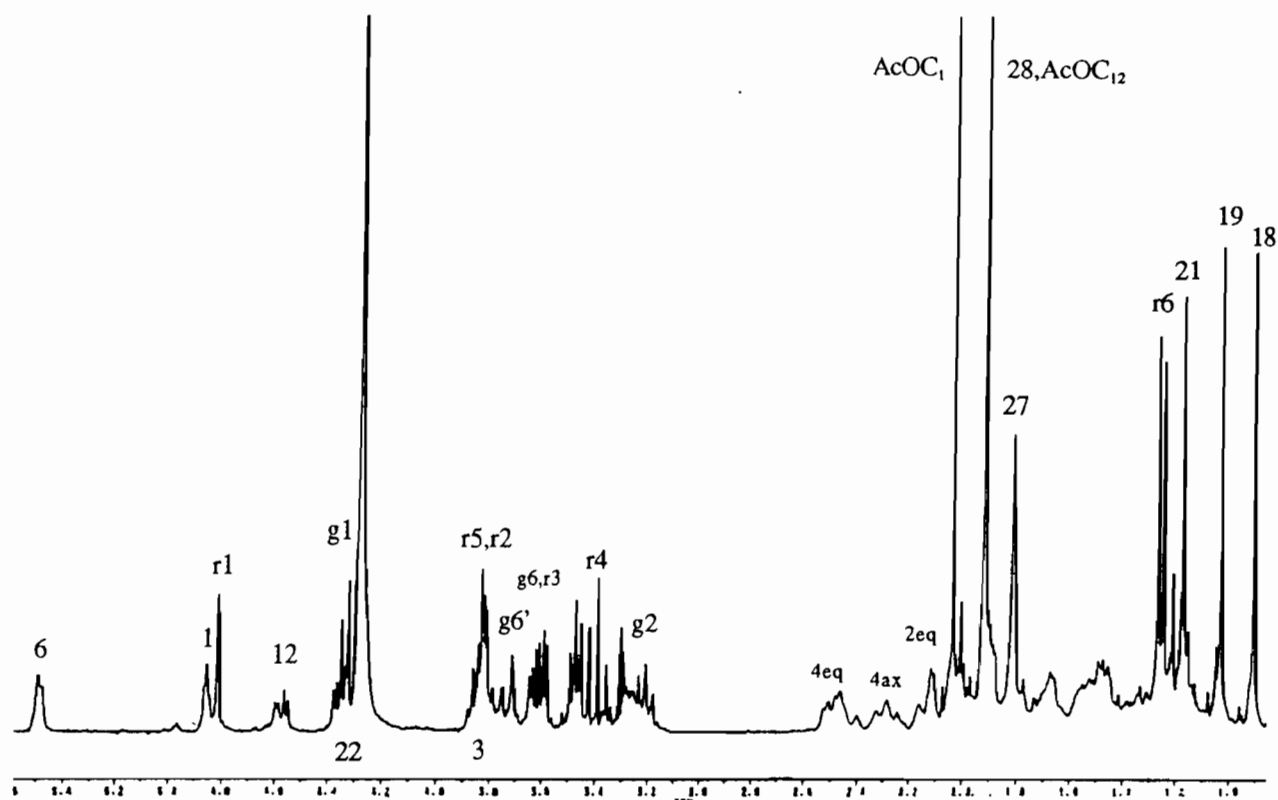


Figure 50. Spectre de RMN ^1H du composé **10** (300 MHz, CDCl_3 - CD_3OD)

Parmi eux, trois méthyles quaternaires à δ 0,91 (H-18), 1,03 (H-19), 1,18 (H-21) et à δ 1,81 (H-27) et 1,91 (H-28), deux méthyles attachés à des carbones sp^2 . Un dernier groupe méthyle apparaît à δ 2,02 correspondant à un acétate.

D'autres signaux sont attribuables:

-un doublet de doublets à δ 4,36 (1H, *dd*, $J_{22, 23a} = 13,3$ Hz, $J_{22, 23e} = 3,5$ Hz, H-22) pour un proton geminé à une fonction lactone,

-un doublet de doublets et un triplet pour des protons geminés aux fonctions oxygénées à δ 4,57 (1H, *dd*, $J_{12, 11a} = 10,3$ Hz, $J_{12, 11e} = 4,0$ Hz, H-12) et à δ 4,85 (1H, *t*, $J_{1, 2e,a} = 2,3$ Hz, H-1),

-un doublet de doublets large pour un proton éthylénique qui apparaît à δ 5,45 (1H, *ddl*, $J_{6, 7a} = 3,4$ Hz, $J_{6, 7e} = 1,4$ Hz, H-6).

IV.6.2.1.1. Structure plane

A partir du groupe CH_3 -19 à δ 1,03 et grâce aux corrélations $^2J_{CH}$ et $^3J_{CH}$ dans le spectre HMBC (Tableau 45), la structure partielle décaline des cycles A et B fusionnés de la Figure 51, a été établie. Le CH_3 -19 corrèle avec les C-1, C-9, C-5 et C-10. Ce dernier est corrélé aussi aux H-4 et à H-6. Les H-4 corréleront en plus avec les C-5, C-6, C-3 et C-2, et le H-6 corrèle avec C-4 et C-8. Les C-5, C-10 et le carbonyle de l'acétate (Figure 51) corréleront au proton H-1 à δ 4,85 (*t*, $J_{1, 2e,a} = 2,3$ Hz) ce qui sous-entend un acétate (δ 171,1 ppm) porté par le carbone C-1.

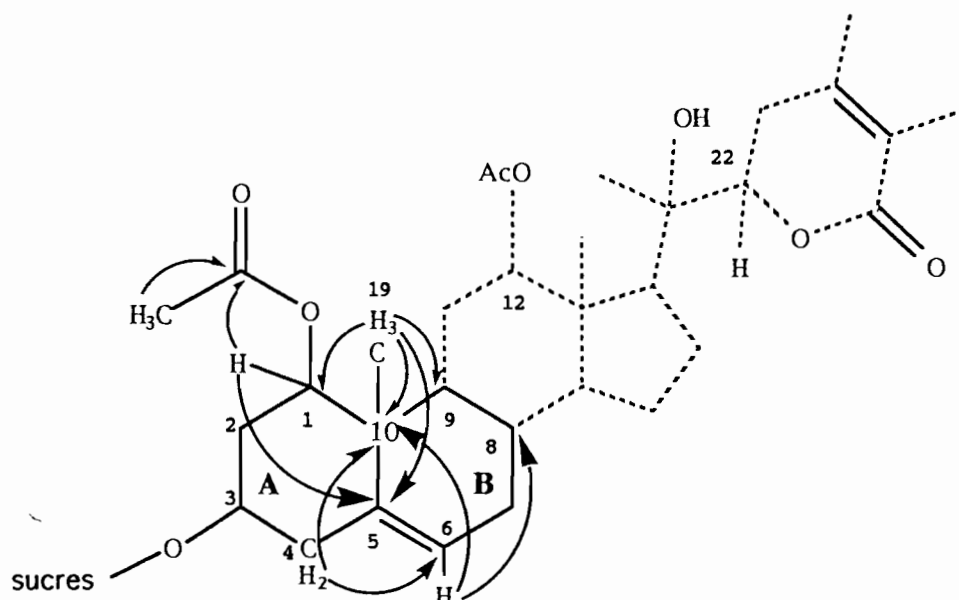


Figure 51. Principales corrélations de la carte HMBC pour la génine du composé 10 (cycles A et B)

L'analyse du spectre COSY (Figure 52 A) permet de relier H-1 aux deux H-2, puis H-3 déblindé à 3,87 ppm porté par un carbone oxygéné, puis les deux H-4; le proton éthylénique H-6 est vicinal aux deux H-7 situés vers 2-2,3 ppm.

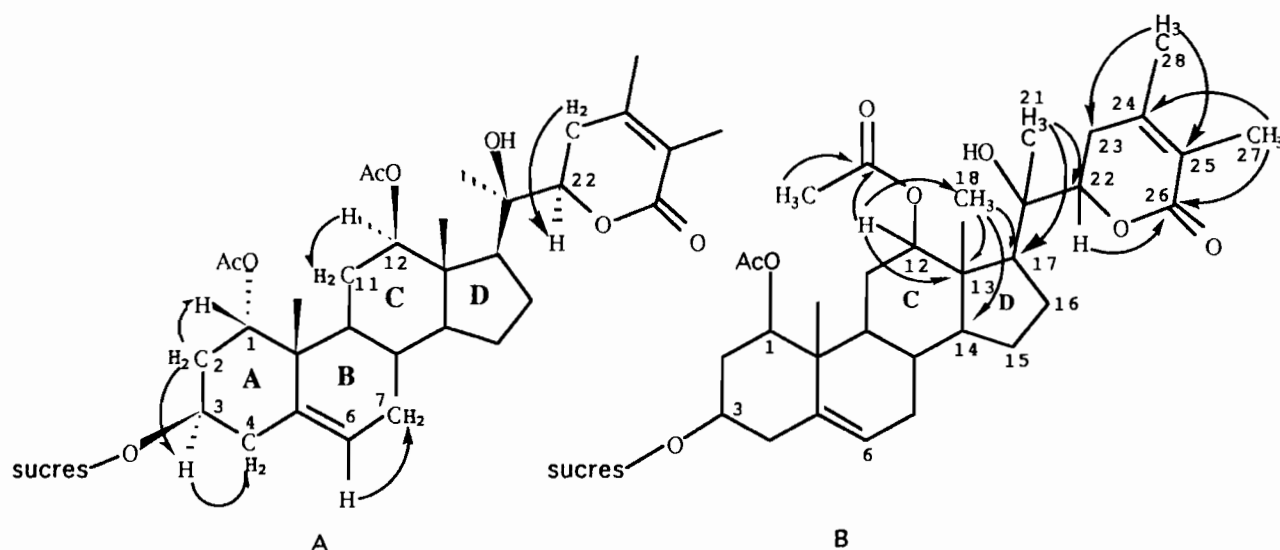


Figure 52. Principales corrélations données par la carte COSY (A) et par la carte HMBC (B) pour la génine du composé 10

La présence de la δ lactone est mise en évidence par les corrélations HMBC suivantes: du H-22 (à 4,36 ppm) au carbonyle lactonique C-26 (à 167,3 ppm), du C-26 au méthyle H-27 (à 1,81 ppm), du CH₃-27 au C-25 (à 121,7 ppm), du C-25 au CH₃-28 (à 1,91 ppm) et du H-28 aux C-24 et C-23 (à 150,5 ppm et 31,5 ppm) (Figure 52 B). Le spectre COSY permet de fermer le cycle par la tache de corrélation entre H-23 et H-22 (Figure 52 A). La chaîne latérale est placée sur le C-17 d'après la corrélation du carbone C-17 (à 55,2 ppm), avec le groupe CH₃-21 (à 1,18 ppm) qui se trouve corrélié également aux C-22 et C-20 (à 81,2 ppm et 74,9 ppm). On peut ainsi envisager la structure partielle substituée de la Figure 52 B (cycles C et D + chaîne latérale). L'analyse du spectre HMBC montre à partir du deuxième méthyle angulaire CH₃-18 (à 0,91 ppm) des corrélations avec C-12, C-13, C-14 et C-17 (Figure 52 B).

Le singulet correspondant aux protons du méthyle d'un deuxième acétate se trouve superposé avec le signal du CH₃-28 à δ 1,91 ppm, fait révélé par la corrélation HMBC qui relie ce signal avec le carbonyle à δ 170,6. Cet acétate est porté par le C-12 d'après la tache de corrélation $^3J_{CH}$ entre H-12 δ 4,57 et ce carbonyle d'acétate (Figure 52 B).

Les spectres RMN ^1H (Figure 53, Tableau 43) et ^{13}C (Tableau 44) du composé **11** montrent pour la partie aglycone, des résonances proches et des multiplicités similaires à celles relevées pour le composé **10**. La différence fondamentale se situe au niveau de l'hydroxyle OH-12 à la place de l'acétate AcO-12 présent dans **10**.

Les déplacements chimiques du C-12 (δ 81,0) et du H-12 (δ 4,57) du composé **10**, se retrouvent blindés respectivement jusqu'à δ 79,7 et δ 3,79 dans le composé **11** (Tableau 43 et Tableau 44). Cet effet est indicatif de la présence de la fonction alcool secondaire C₁₂-OH libre dans le composé **11**.

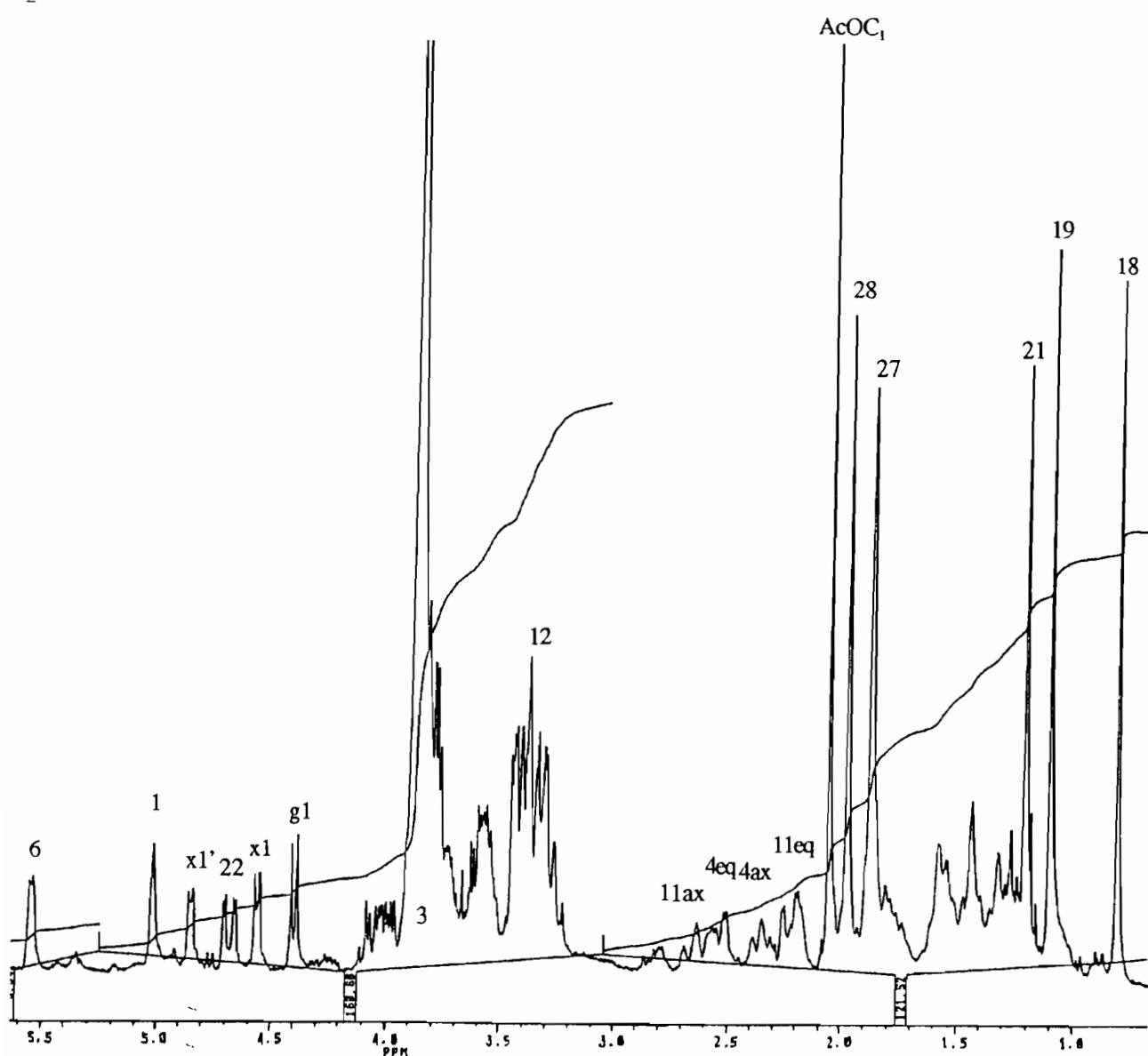


Figure 53. Spectre RMN ^1H du composé **11** (300 MHz, CD_3OD)

IV.6.2.1.2. Stéréochimie

Le proton H-12 du composé **10** est en position α axiale du fait de sa constante de couplage diaxiale ($J = 10,3$ Hz) avec le H-11 axial. Le proton H-1 possède une constante identique et faible ($J = 2,3$ Hz) avec les deux protons H-2. Ceci tend à le placer en position β équatoriale. Il possède un effet Overhauser dans le spectre ROESY avec le CH₃-19 et avec le H-11 équatorial à 1,55 ppm; mais aucun effet est observé entre H-1 et H-3.

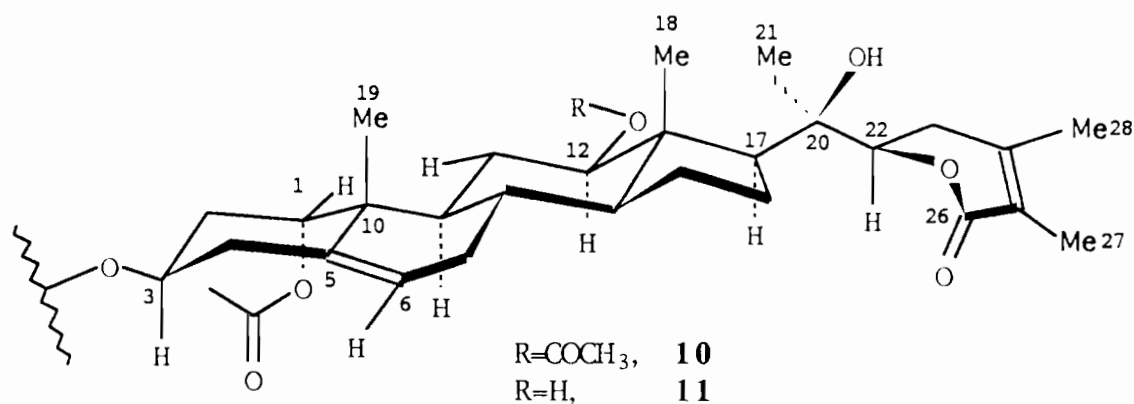
Le déplacement chimique du méthine H-3 (δ 3,87) indique l'orientation α axial du H-3 d'après la similarité existante entre cette valeur et celles des protons géminés à des fonctions alcool secondaire en position α axial suivantes:

Proton	δ (ppm)	Withanolide	Référence
H-3 α axial	3,80	1 α -acétoxydunawithagénine (physalolactone B)	85, 81
H-3 α axial	3,87	(20S,22R)-1 α -acétoxy-3 β -hydroxy-witha-5,24-dienolide	85
H-3 α axial	3,87	3 β ,20 α_F -dihydroxy-1-oxo-20R,22R-witha-5,24-dienolide	124
H-7 α axial	3,85	(20R:22S)-4 β ,7 β ,20-trihydroxy-1-oxo-witha-2,5,24-trienolide	125

La chaîne latérale portée par le C-17 (composés **10** et **11**) se trouve orientée en position β d'après les valeurs typiques du C-20 à δ 74,9 (**10**) et δ 73,9 (**11**) qui contrastent avec des valeurs usuelles de déplacements chimiques du C-20 pour des withanolides à chaîne latérale α -orientée par exemple: δ 77,5 (acétate de physalolactone C),⁸⁹ δ 78,8 (withaperuvine),⁸⁹ δ 79,6, δ 78,3, δ 79,1 (withaperuvine C, D et H)⁸⁹ et δ 79,2 (5 α -éthoxy-6 β -14 α ,17 β ,20 α_F -tetrahydroxy-1-oxo-20S,22R-witha-2,24-dienolide).¹²⁴ L'expérience ROESY n'a pas permis d'établir des corrélations pour confirmer l'orientation de la chaîne latérale.

La stéréochimie du C-20 pour les composés **10** et **11** reste définie comme étant 20R. Comme pour les composés **8** et **9** la justification fait suite à une analyse comparée des valeurs de δ du H-21 avec celle observée dans les hydroxy-20 cholestérol.¹²³ Ce calcul appliqué aux composés **10** et **11**, permet de constater une différence de $\Delta\delta = +0,28$ ppm (**10**) et $\Delta\delta = +0,30$ ppm (**11**) pour H-21, ce qui est en faveur d'une orientation α du H-21 (20 β -OH). Un effet Cotton (+) à 250 nm (**10**) et 248 nm (**11**) dans les courbes de dichroïsme circulaire indique une configuration 22R. L'établissement de toutes les corrélations mentionnées et l'analyse structurale correspondant a permis d'identifier la nouvelle génine

du composé **10**, comme étant le (20*R*,22*R*)-1 α ,12 β -diacétoxy-3 β ,20 α_F -dihydroxy-witha-5,24-dienolide et la génine du composé **11** comme le (20*R*,22*R*)-1 α -acétoxy-3 β ,12 β ,20 α_F -trihydroxy-witha-5,24-dienolide correspondant à la génine de la dunawithanine F.⁸²



Les structures proposées ont été confirmées par l'analyse comparative avec des données spectrales déjà publiées sur la dunawithagénine ou 1 α ,3 β ,20 α_F -trihydroxy-20*R*,22*R*-witha-5,24-dienolide,¹²⁴ (Tableau 43 et Tableau 44).

L'identification de la génine dans les composés **10** et **11** comme un dérivé de la dunawithagénine,¹²⁴ permet d'adopter la stéréochimie de celle-ci préalablement obtenue par des méthodes cristallographiques.¹²⁶

IV.6.2.1.3. Structure de la chaîne diosidique de **10**

Dans le spectre RMN ¹H (Figure 50) on observe entre 3,10 et 3,80 ppm, un ensemble de signaux pour des protons osidiques. L'expérience COSY (Figure 54) révèle que cet ensemble se trouve en relation avec deux signaux de protons anomériques, à δ 4,34 (1H, *d*, $J_{g1,g2} = 7,6$ Hz, *g*1) et δ 4,81 (1H, *d*, $J_{r1,r2} = 1,6$, *r*1).

Le spectre RMN ¹H (Figure 50) présente un doublet à δ 1,26 (3H, *d*, $J_{r6,r5} = 6,1$ Hz, *r*6) corrélé dans le spectre COSY à un proton osidique à δ 3,83 (*qd*, $J_{r5,r4} = 9,4$ Hz, $J_{r5,r6} = 6,6$ Hz, *r*5) appuiant l'hypothèse de la présence d'un rhamnose.

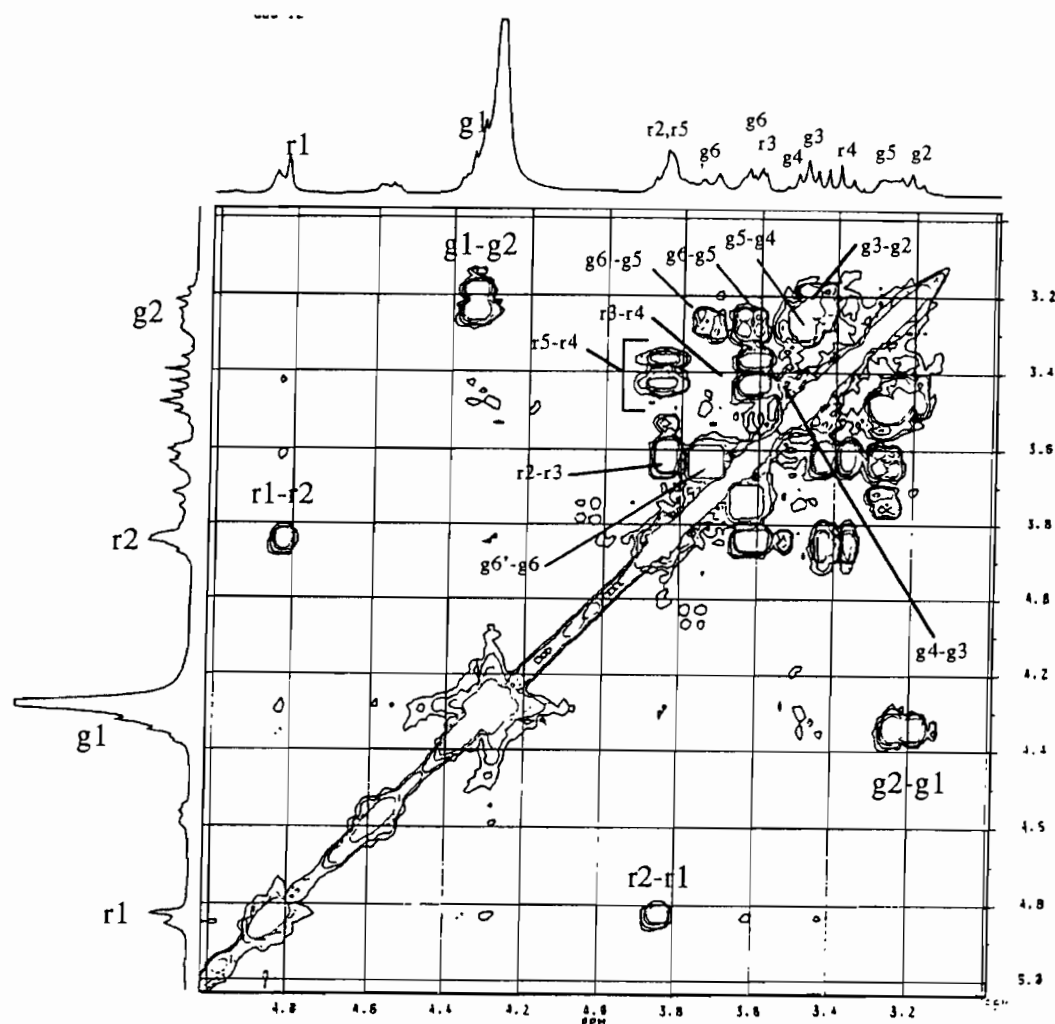


Figure 54. Agrandissement du spectre COSY (zone sucres) du composé 10

Les protons anomériques corrélient dans le spectre XHCORR (Figure 55) avec les carbones à δ 101,1 (*d*, g1) et à δ 101,9 (*d*, r1) du spectre de RMN ^{13}C J modulé (Tableau 44). Dix carbones entre δ 61 et 79 ppm se répartissent en neuf carbones oxyméthines et un oxyméthylène; un méthyle de rhamnose est détecté à δ 17,4 (*q*, r6). Ces données sont indicatives de la présence d'un hexose et d'un rhamnose.

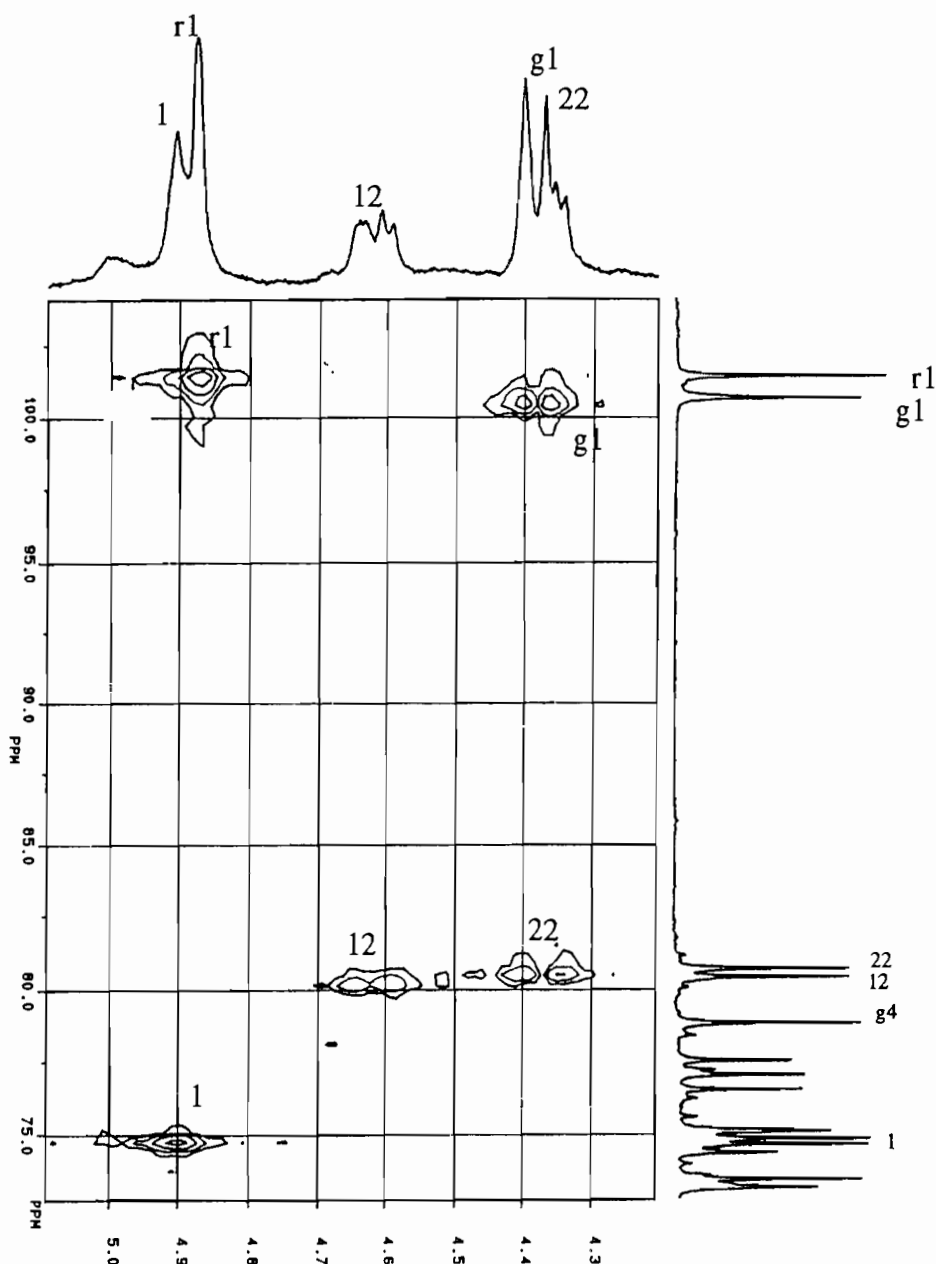


Figure 55. Agrandissement du spectre XH-CORR de corrélation hétéronucléaire directe du composé **10**

Dans le spectre COSY (Figure 54) un système de spins couplés formé de 4 CHOH et d'un groupe CH_2OH a été établi à partir du signal du proton anomérique à δ 4,34 (1H, d , $J_{g1,g2} = 7,6$ Hz, g1). La carte HOHAHA (Figure 56) corrobore l'attribution des protons osidiques. Les signaux suivants ont été identifiés:

$-\delta$ 4,34 (1H, d , $J = 7,6$ Hz, g1),

- δ 3,21 (1H, *t*, $J = 8,3$ Hz, g2),
- δ 3,44 (1H, *m*, g3),
- δ 3,51 (1H, *m*, g4),
- δ 3,28 (1H, *m*, g5),
- δ 3,62 (1H, *dd*, $J_{g6,g6'} = 11,9$ Hz, $J_{g6,g5} = 4,9$ Hz, g6) et
- δ 3,73 (1H, *dd*, $J_{g6',g6} = 11,9$ Hz, $J_{g6',g5} = 1,7$ Hz, g6').

Seuls les signaux pour les protons g1, g2, g6 et g6' restent définis et la mesure de leur constantes de couplage indique une position axiale pour g1 et g2.

Pour établir l'identité du sucre, les spectres du proton et COSY (Figure 57) ont été enregistrés sur le dérivé acétylé **10a**. L'établissement des corrélations à partir du g1 jusqu'au g6 permet d'établir une orientation axiale d'après leur constantes de couplage transdiaxiales $^3J_{HH}$ (Tableau 43) des protons g1 à g5; il s'agit du triacétyl- β -D-glucose.

Pour le deuxième sucre, les spectres COSY (Figure 54) et HOHAHA (Figure 56) du composé **10** permettent d'identifier une conformation diéquatoriale entre r1→r2 à δ 4,81 (1H, *d*, $J_{r1,r2} = 1,6$ Hz, r1) et à δ 3,82 (1H, *dd*, $J_{r2,r3} = 3,2$ Hz, $J_{r2,r1} = 1,9$ Hz, r2). Les conformations diaxiales de r3, r4 et r5 sont établies d'après leurs constantes de couplage vicinales supérieures à 9 Hz. Une conformation équatoriale-axiale de r2eq→r3ax est déduite de leur constante de couplage $J = 3,2$ Hz (Tableau 43). Il s'agit bien d'un α -L-rhamnose.

L'attribution des résonances osidiques du spectre de RMN ^{13}C du composé **10** a été accomplie d'après l'analyse du spectre XHCORR.

L'établissement du point d'ancrage de la chaîne osidique sur l'aglycone a été visualisé par un effet Overhauser ROE (ROESY) du proton anomérique du glucose g1 à δ 4,34 avec le H-3 de la génine à δ 3,87, fait qui prouve que la chaîne osidique se trouve greffée sur le C-3 de la génine (Figure 58).

Néanmoins, à cause de la superposition des signaux osidiques, la séquence osidique n'a pas pu être établie par la ROESY qui montre de manière ambiguë deux possibilités: rhamnose(1→4)glucose ou rhamnose(1→3)glucose (Figure 58). La réponse définitive est obtenue de la carte HMBC, où le proton r1 corrèle en 3J avec le carbone g4 (Figure 58).

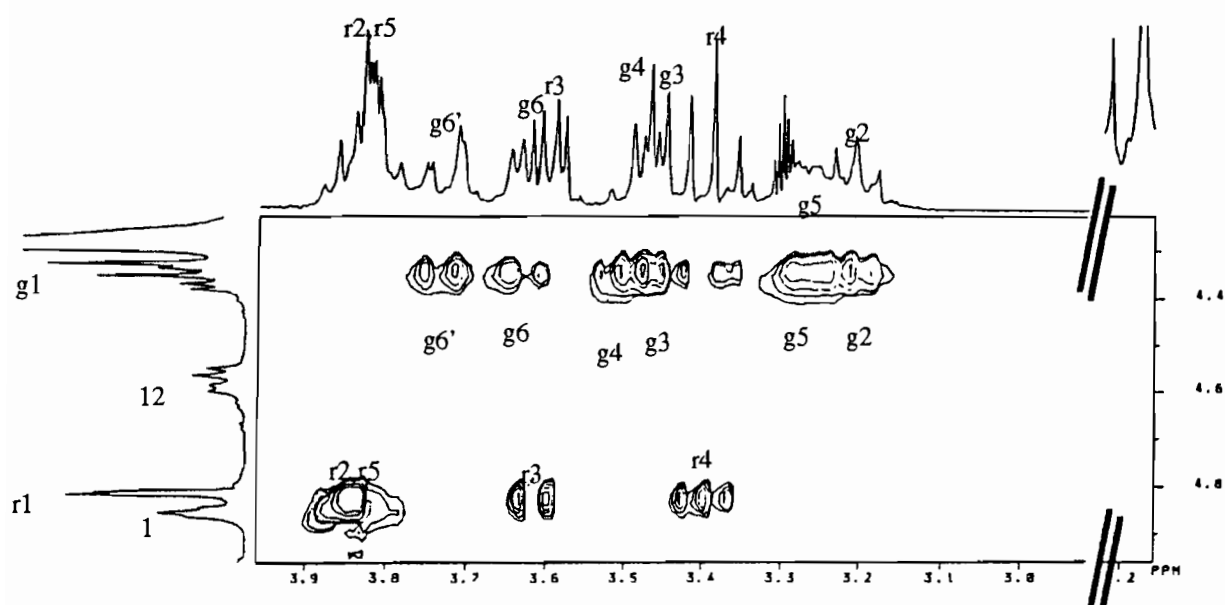


Figure 56. Agrandissement de la zone osidique du spectre HOHAHA du composé 10

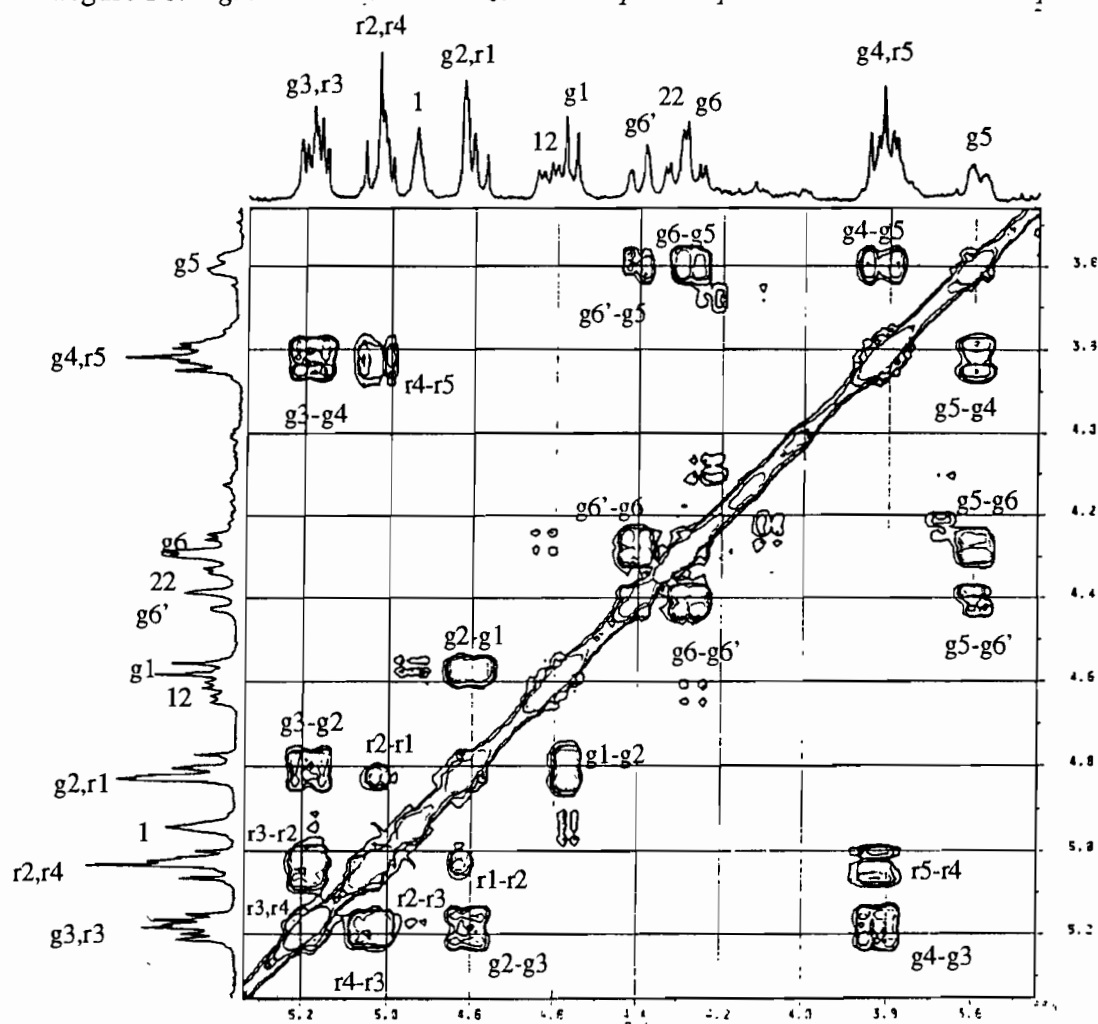


Figure 57. Agrandissement de la zone osidique du spectre COSY du composé 10a

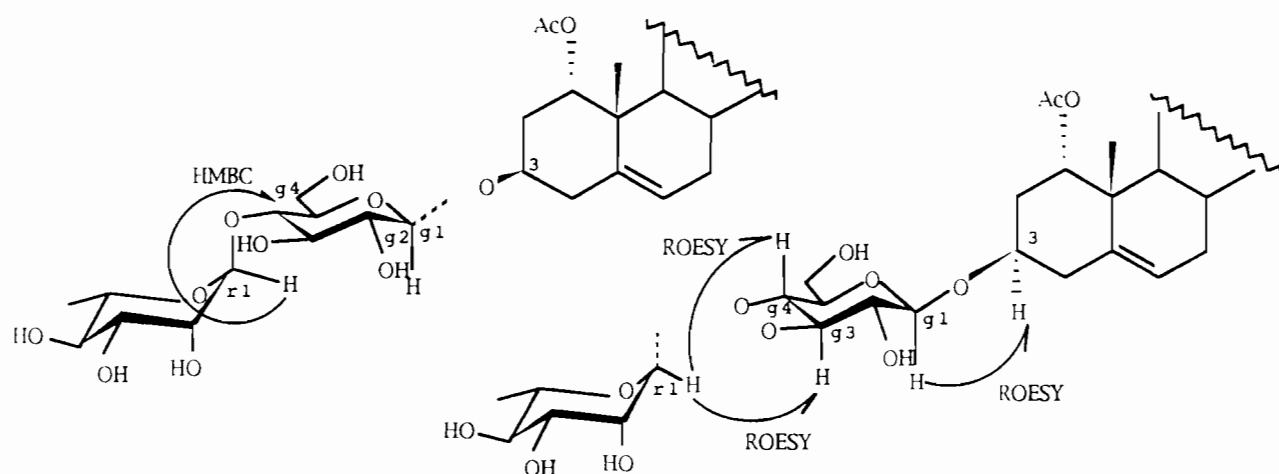


Figure 58

Cet enchaînement [rhamnose(1→4)glucose] est confirmé par l'observation d'un grand déblindage de $\Delta\delta +1,76$ ppm du proton g3 à $\delta 5,18$ ppm du glucose dans le dérivé acétylé **10a**. Ceci prouve que le rhamnose ne se trouve pas attaché en position 3 du glucose. Le proton g4 à $\delta 3,51$ (m) dans le composé **10** reste pratiquement inchangé à $\delta 3,83$ (t, $J = 9,3$ Hz, g4) dans le dérivé acétylé **10a**, fait qui prouve que cette position n'a pas été touchée par la réaction d'acétylation. Donc, la nature de la séquence des sucres est la suivante: α -L-rhamnopyranosyl(1→4)- β -D-glucopyranosyl(1→3)-génine. Le composé **10** est le (20*R*,22*R*)-O-(3)-[α -L-rhamnopyranosyl(1→4)- β -D-glucopyranosyl]-1 α ,12 β -diacétoxy-20-hydroxy-witha-5,24-dienolide.

IV.6.2.1.4. Structure de la chaîne triosidique de **11**

Dans la zone des protons osidiques ($\delta 3,20$ à $4,10$) du spectre RMN ^1H (Figure 53) trois signaux de protons anomériques pour trois oses ont été trouvés à:

- δ 4,39 (1H, *d*, $J_{g1,g2} = 7,8$ Hz, *g*1),

- δ 4,56 (1H, *d*, $J_{x1,x2} = 6,5$ Hz, *x*1) et

- δ 4,84 (1H, *m*, $W_{1/2} = 8,0$ Hz, *x'*1),

Ceux-ci correspondent à travers l'expérience HMQC aux carbones anomériques à:

- δ 100,6 (*d*, *g*1),

- δ 101,9 (*d*, *x*1) et

- δ 102,1 (*d*, *x'*1).

Le spectre RMN ^{13}C J modulé (Tableau 44) montre entre δ 60,5 to δ 77,1 les signaux de douze oxyméthines et un oxyméthylène pour un hexose et deux pentoses.

Des corrélations homonucléaires COSY et HOHAHA (Figure 59) à partir des signaux des protons anomériques à δ 4,39 (*g*1), δ 4,56 (*x*1) et δ 4,84 (*x'*1) permettent d'établir un groupe de sept protons pour un hexose et deux groupes de six protons pour deux pentoses (Tableau 43).

Les spectres du proton et COSY (Figure 60) ont été enregistrés sur le dérivé acétylé **11a**. L'interprétation de ces spectres a conduit à l'établissement d'un système de spins pour lesquels l'orientation axiale de *g*1, *g*2, *g*3, *g*4 et *g*5 a été déterminée d'après la valeur de leurs constantes de couplage (Tableau 43). Cette attribution a permis d'identifier un diacétyl- β -D-glucose.

Le spectre COSY du dérivé **11a** (Figure 60) permet aussi d'identifier les systèmes de spins de deux xyloses: *x*1-*x*5 et *x'*1-*x'*5, avec des constantes de couplage traduisant une orientation axiale pour ces protons (Tableau 43). Il s'agit de deux triacétyl- β -D-xyloses.

L'observation des protons osidiques (à exception de l'anomérique) déplacés vers des hautes fréquences pour les deux xyloses dans le dérivé peracétylé **11a** (Tableau 43) est indicatif du caractère terminal de ces unités. La similitude des déplacements des protons *g*3 (δ 3,87) et *g*4 (δ 3,69) du diacétyl-glucose de **11a** avec ceux à δ 3,80 et 3,80 du composé natif **11** signalent que ces protons sont géminés à des fonctions oxygénées non acétylées. Ce fait permet de définir les points de substitution de la séquence de sucres comme: [β -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)][β -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopyranosyl-O-génine (Figure 61).

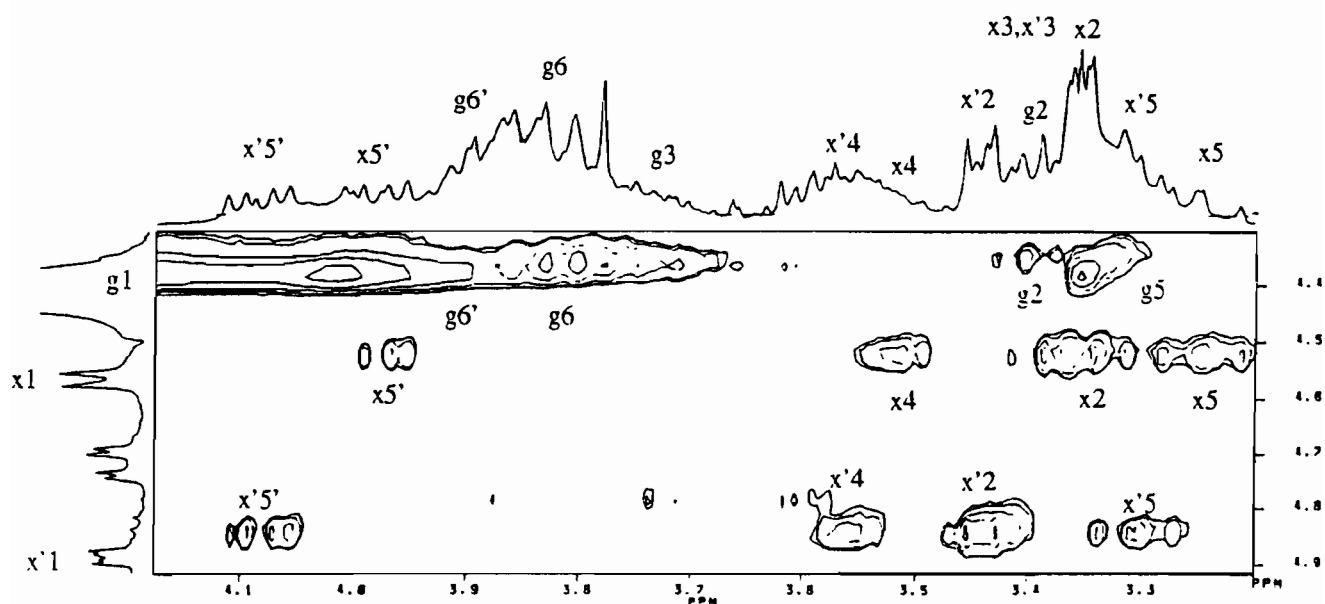


Figure 59. Agrandissement de la zone osidique du spectre HOHAHA du composé 11.

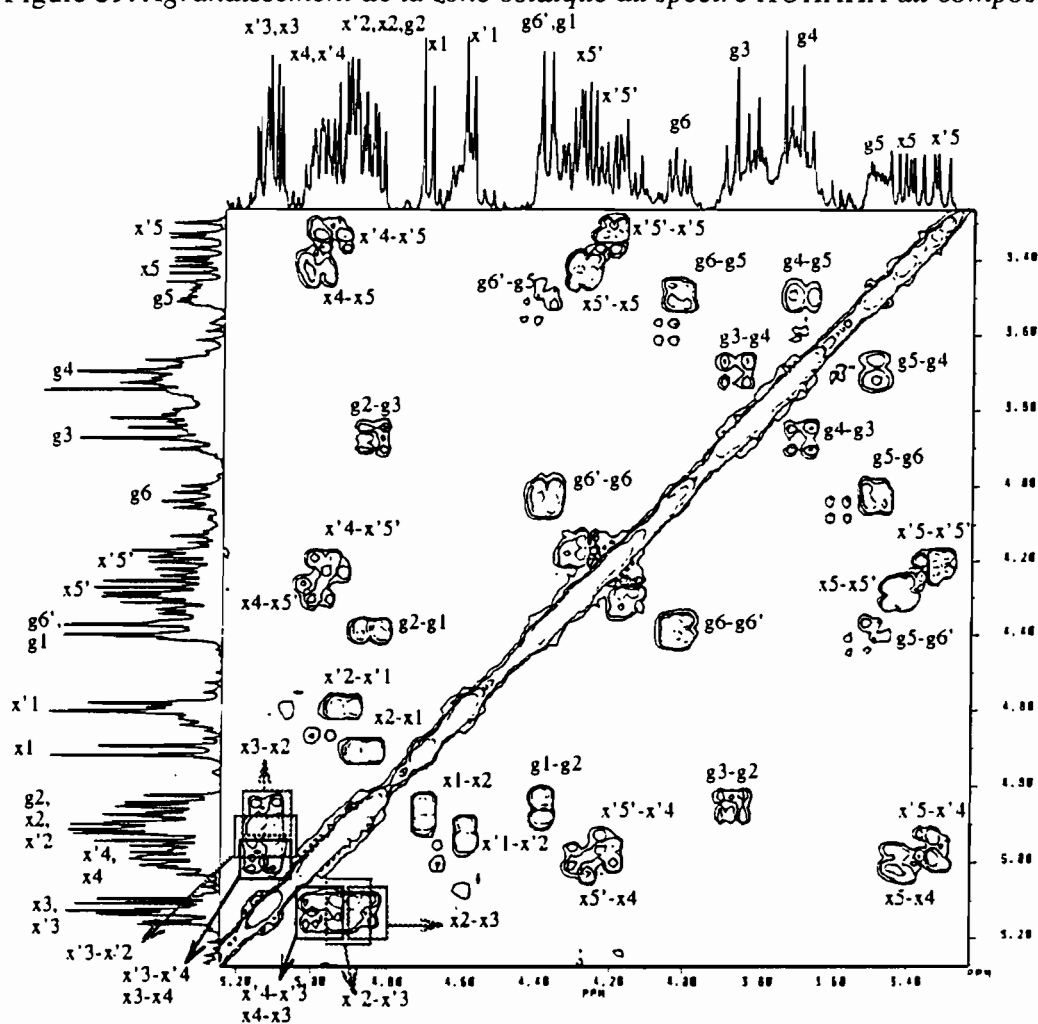


Figure 60. Agrandissement de la zone osidique du spectre COSY du composé 11a.

Ce trisaccharide se trouve branché en position C-3 de la génine d'après la comparaison de la valeur du déplacement chimique du H-3 à 3,89 ppm en **11** avec celui du H-3 à 3,87 ppm dans **10**, et avec ceux de la littérature: δ 3,89 (H-3) et δ 3,87 (H-3) de dunawithanines C et E⁸² (Figure 61).

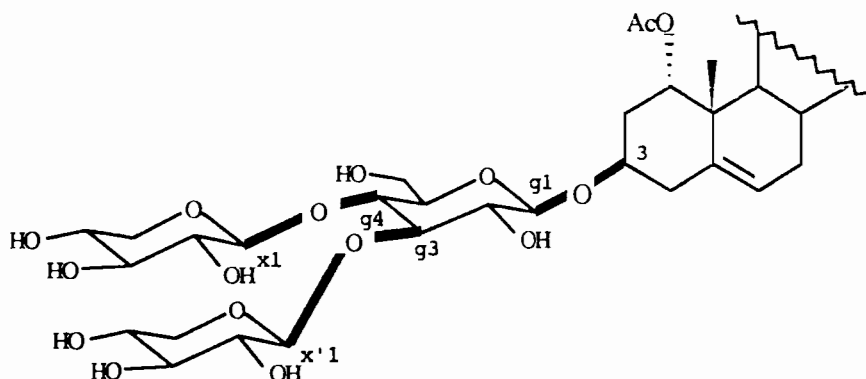


Figure 61

L'attribution complète des spectres de RMN ^{13}C des carbones osidiques des composés **11** et **11a** a été possible par l'interprétation des spectres HMQC.

IV.6.2.2. Analyse des spectres de masse

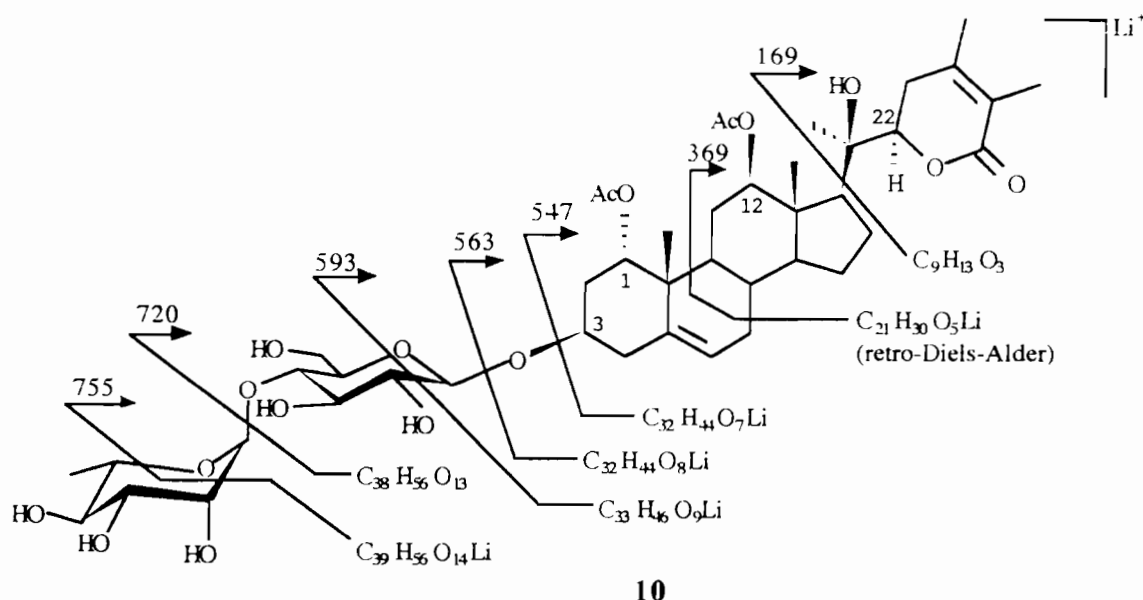
En collaboration avec les chercheurs Dr. B. C. Das, Dr. O. Laprévote et Mr. A. Sérani du service de spectrométrie de masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif sur Yvette, une étude approfondie des spectres de masse des composés **10** et **11**, et de leurs dérivés acétylés **10a** et **11a** a été réalisée.

Des spectres ont été enregistrés à l'aide de différentes techniques: par bombardement d'ions lourds (Cs^+) sur une matrice contenant l'échantillon (ou LSIMS), ou par bombardement d'atomes accélérés (Ar) dans la technique FAB. La spectrométrie de masse par tandem (MS/MS) a été également utilisée pour analyser la fragmentation des composés **10** et **11**. Les résultats présentés sont le résultat des analyses établies par A. Sérani et O. Laprévote.

IV.6.2.2.1. FAB et LSIMS

Le spectre de masse FAB positif de **10** décrit un ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Li}]^+$ à m/z 873 analysé pour une formule moléculaire en $\text{C}_{44}\text{H}_{66}\text{O}_{17}\text{Li}$. La perte de la chaîne osidique d'une part et d'autre de la liaison acétalique sur le C-3 procure un ion à m/z 547 et à m/z 563 d'où une masse de 556 uma pour

l'aglycone analysée comme $C_{32}H_{44}O_8$. La perte du rhamnose terminal est mise en évidence par l'ion à m/z 720 $[M+H\text{-rhamnose}]^+$ et à m/z 726 $[M+Li\text{-rhamnose}]^+$. Des pics à m/z 593 pour un ion de type $^{1,5}X_{glu}$ et à m/z 755 pour un ion type du $^{1,5}X_{rha}$, confirment l'enchaînement glucose-rhamnose. Le pic à m/z 369 ($C_{21}H_{30}O_5Li$) correspond à une fragmentation retro-Diels-Alder dans le cycle B de l'aglycone.



Le spectre de masse LSIMS (Figure 62 A) du produit **11** enregistré dans le NBA additionné d'iodure de lithium montre un pic à m/z 949 attribuable à l'ion $[M+Li]^+$ analysé pour $C_{46}H_{70}O_{20}Li$ et issu d'un composé de poids moléculaire 942. Le spectre montre également un second pic pseudomoléculaire à m/z 965 dû à l'ion $[M+Na]^+$, analysé pour $C_{46}H_{70}O_{20}Na$. On note, à m/z 955 un ion $[M+2Li-H]^+$ correspondant vraisemblablement à l'échange d'un proton labile par un lithium.

Le spectre de masse LSIMS du dérivé peracétylé **11a** enregistré dans les mêmes conditions montre un ion $[M+Li]^+$ à m/z 1327, ($C_{64}H_{88}O_{29}Li$) (Figure 62 B). Ce spectre révèle la présence d'un autre composant minoritaire complètement acétylé **11c** de masse supérieure à m/z 1369, ($C_{66}H_{90}O_{30}Li$) $[M+42+Li]^+$. Ces valeurs de poids moléculaire sont en accord avec les structures proposées (Figure 63).

D'après le spectre LSIMS (Figure 62 C), le dérivé acétylé **10a** possède son ion moléculaire lithié $[M+Li]^+$ à m/z 1125 ($C_{56}H_{78}O_{23}Li$). Il se présente mélangé avec un dérivé minoritaire peracétylé (AcO-20) **10c** à m/z 1167 ($[M+42+Li]^+$, $C_{58}H_{80}O_{24}Li$), (Figure 64).

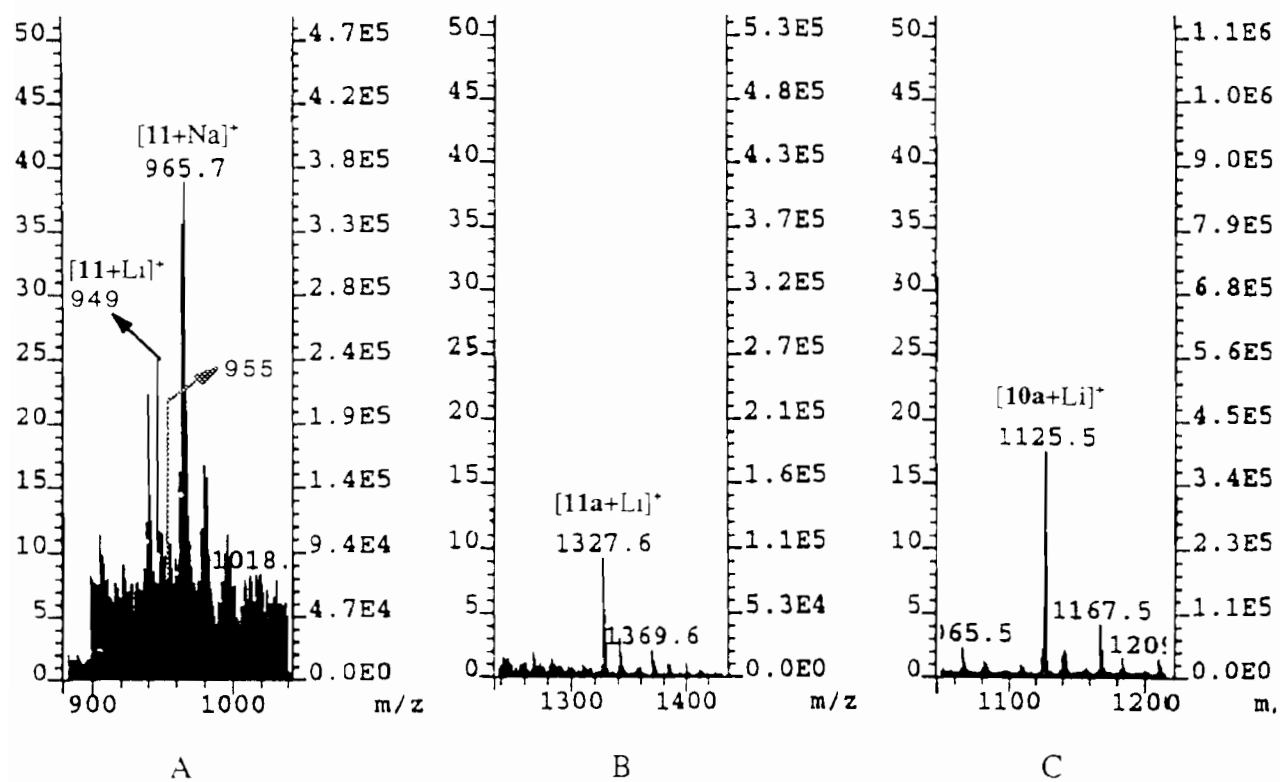
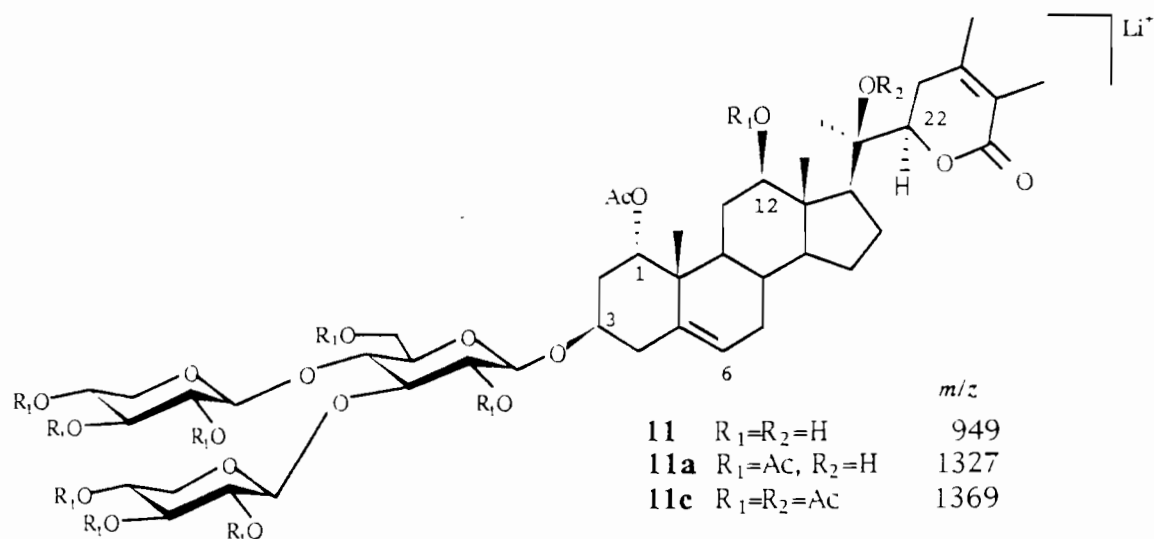
Figure 62. Extraits des spectres de masse LSIMS des composés **11** (A), **11a** (B) et **10a** (C)

Figure 63

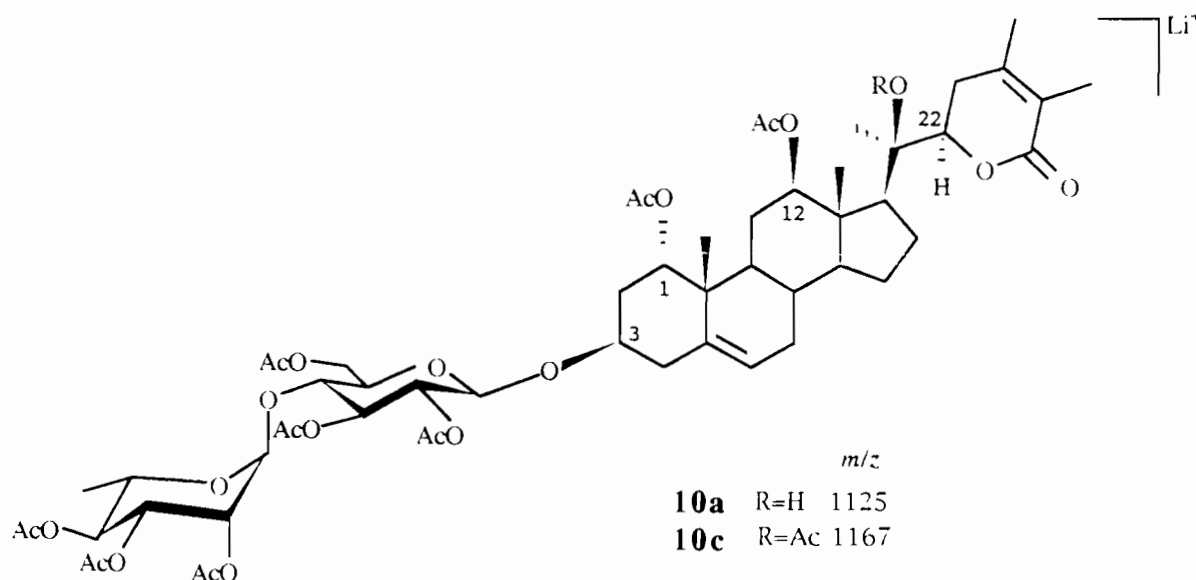


Figure 64

IV.6.2.2.2. Spectres de masse en tandem

Composés 11 et 11a

Le spectre MS/MS (Figure 65) de l'ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ de **11** à m/z 965 ($C_{46}H_{70}O_{20}Na$) montre un fragment très majoritaire à m/z 905 correspondant à la perte d'une molécule d'acide acétique à partir de l'ion précurseur. Dans la partie médiane du spectre, l'ion à m/z 467 correspond à l'enchaînement triosidique en position 3 alors que les ions à m/z 479 $[aglycone-HOAc+Na]^+$ et 461 $[aglycone-HOAc-H_2O+Na]^+$ concernent la partie aglycone de la molécule (aglycone analysée pour $C_{30}H_{44}O_7$). Cette attribution est confirmée dans le spectre MS/MS (Figure 66) de l'ion pseudomoléculaire du dérivé peracétylé **11a**, $[M+Li]^+$ à m/z 1327 ($C_{64}H_{88}O_{29}Li$) par la présence d'un fragment similaire à m/z 787 $[trisaccharide+Li]^+$ et un second à m/z 547 correspondant au fragment $[aglycone-H_2O+Li]^+$.

Fragmentation de la partie osidique

Un ion de type $^{1,5}X_{\text{cyl}}$ à m/z 861, formé à partir du précurseur $[11+Na]^+$ (Figure 65), est déplacé à m/z 1097 dans le cas du spectre de l'ion $[11a+Li]^+$ (Figure 66). Cette fragmentation indique la présence de résidus pentose en position terminale de la chaîne triosidique. Un ion $^{0,2}X_{\text{cyl}}$ à m/z 875 formé à partir de $[11+Na]^+$ dans la Figure 65 est en accord avec cette hypothèse.

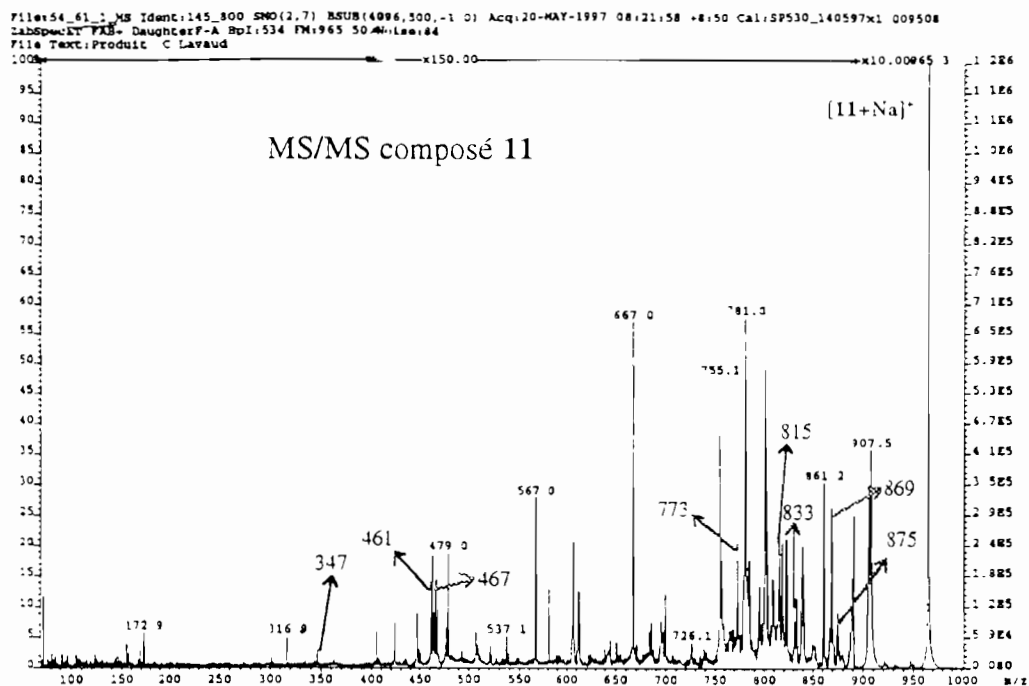


Figure 65. Spectre MS/MS du composé 11

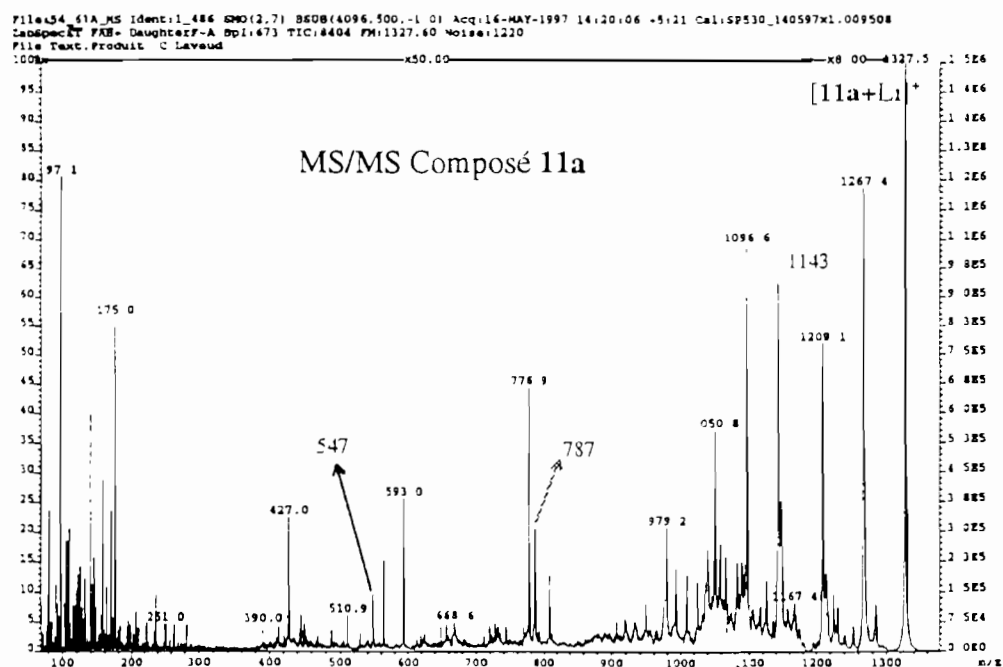


Figure 66. Spectre MS/MS du composé 11a

Le sucre central est un hexose dont l'hydroxyle en 2 est libre. Ce résultat se déduit des fragments à m/z 567 ($^{1,5}X_{glu}$) et 581 ($^{0,2}X_{glu}$) observés sur le spectre MS/MS de l'ion $[11+Na]^+$. L'ion $^{1,5}X_{glu}$ central apparaît également, déplacé à m/z 593, sur le spectre MS/MS de l'ion $[11a+Li]^+$. La nature

ramifiée de l'enchaînement trisaccharide est déduite de la présence d'un ion à m/z 667 [$11+\text{Na}$ - $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$] $^+$ qui correspond à la perte de deux pentoses terminaux à partir de [$11+\text{Na}$] $^+$. Cette structure, de même que la substitution en 3 et 4 du glucose central par les pentoses est confirmée par la présence d'un fragment $A_{2,4}$ à m/z 347 (Figure 67 A). L'ion à m/z 667 est déplacé à m/z 777 ([$11a+\text{Li}$] $^+$ - $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$) lorsque cette fragmentation se produit à partir du précurseur [$M+\text{Li}$] $^+$ du dérivé peracétylé 11a (Figure 67 B) On note enfin, à m/z 815, un ion correspondant à la perte d'une molécule de pentose à partir de l'ion [$11+\text{Na}$] $^+$. La perte conjointe d'acide acétique et d'un pentose conduit à un fragment intense à m/z 755 (Figure 65).

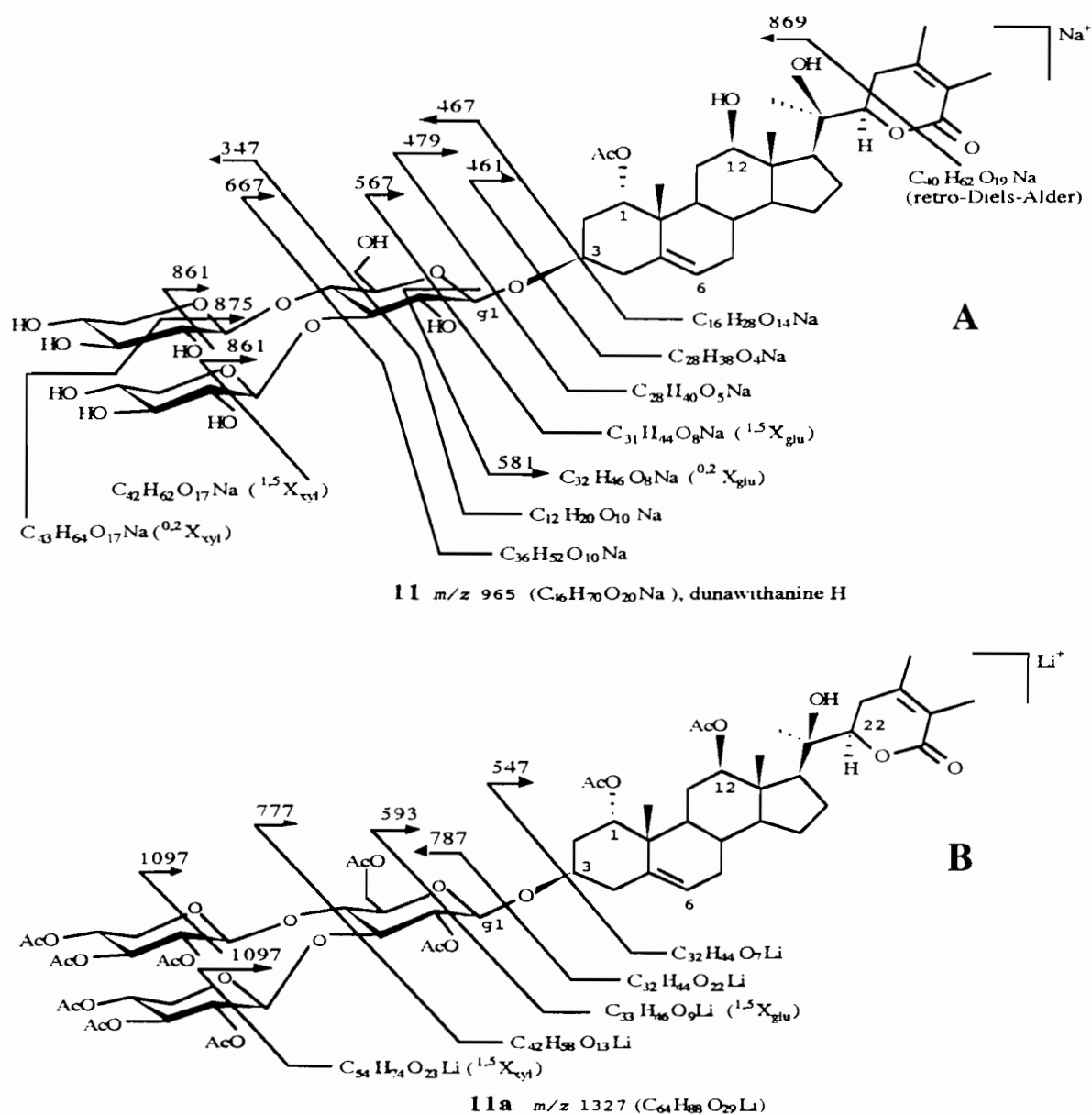
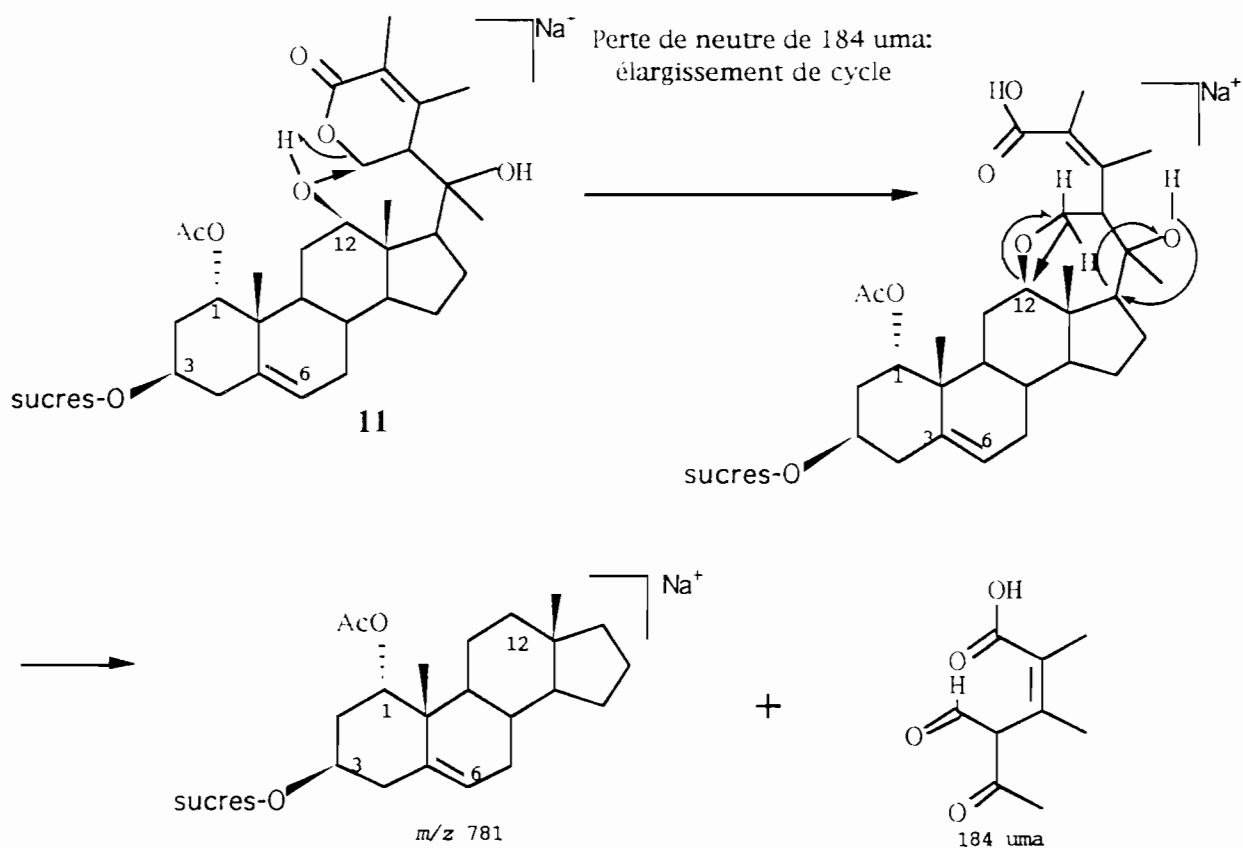


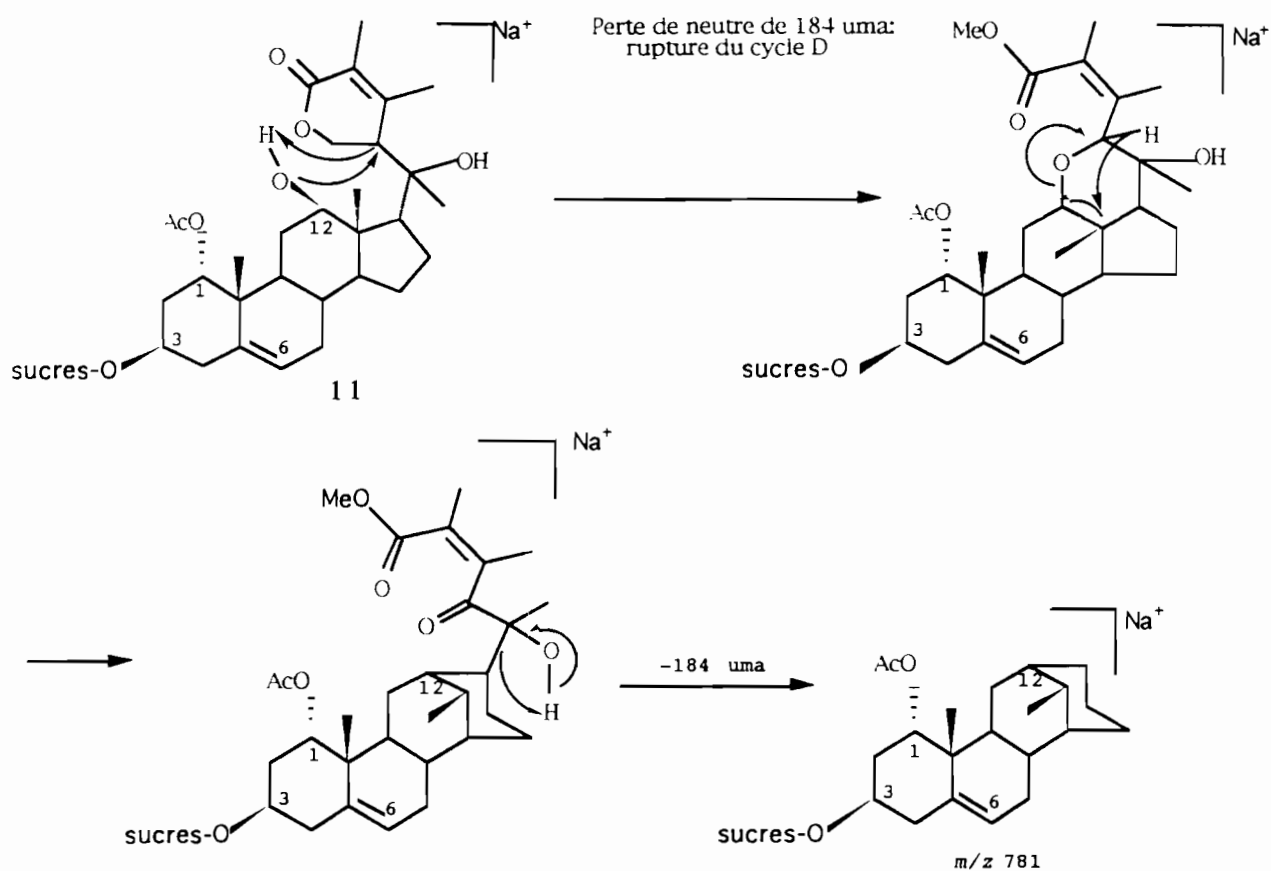
Figure 67 A et B

Fragmentation de la partie aglycone

Un ion à m/z 869 est un fragment issu de $[11 + Na]^+$ par un mécanisme retro-Diels-Alder sur le cycle δ -lactone.

Dans la Figure 65 un pic à m/z 781 obéit à la perte de 184 uma à partir de l'ion précurseur $[11 + Na]^+$. Cette fragmentation suggère une ouverture de la lactone par une attaque nucléophile de l'OH en 12. Deux types de réarrangements sont envisageables, chacun impliquant le transfert de deux hydrogènes et procédant pour l'un d'un élargissement de cycle, pour l'autre d'une rupture du cycle D.





Composé 10a

Dans le cas du produit **10a** (Figure 68), les spectres MS/MS de l'ion pseudomoléculaire $[M+Li]^+$ à m/z 1125 ($C_{56}H_{78}O_{23}Li$) se fragmente en donnant des pics à m/z 593 ($^{1,5}X_{glu}$) et 881 ($^{1,5}X_{rha}$) qui confirment l'enchaînement glucose-rhamnose en position 3. L'ion à m/z 835 [**10a** + $Li-C_{12}H_{18}O_8$] $^+$ et celui à 777 [**10a** + $Li-C_{12}H_{17}O_8-OAc$] $^+$ caractérisent la perte du rhamnose et sa position terminale. La rupture de la liaison acétalique sur le C-3 conduit à une série d'ions: à m/z 563 [aglycone + Li] $^+$, à m/z 547 [aglycone + $Li-O$] $^+$ d'où une aglycone en $C_{32}H_{44}O_7$, et à m/z 585 [disaccharide + Li] $^+$ ($C_{24}H_{34}O_{16}$). Deux pertes d'unités AcOH à partir de m/z 547 conduit à l'ion à m/z 427.

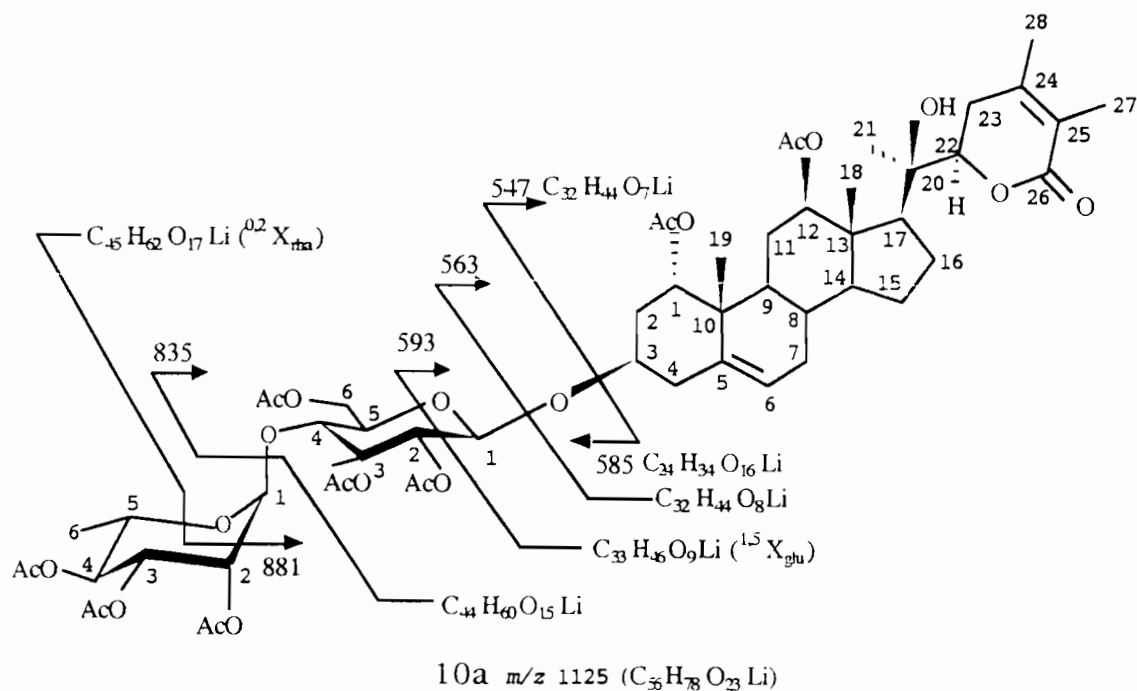


Figure 68.

IV.6.2.3.Conclusion

Cette discussion propose deux nouveaux withanolides glycosylés naturels, le composé **10**: (20*R*,22*R*)-O-(3)-[α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyl] - 1 α ,12 β -diacétoxy-20-hydroxy-witha-5,24-diénolide et le composé **11**: (20*R*,22*R*)-O-(3)-{[β -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glucopyranosyl}- 1 α - acétoxy - 12 β ,20 - dihydroxy - witha-5,24-diénolide.

Les nouvelles caractéristiques structurales pour la chimie des withanolides glycosylés apportées par la dunawithanine G (**10**) sont: une génine nouvelle, la présence de rhamnose, et une nouvelle séquence osidique.

La nouveauté de la dunawithanine H (**11**) résulte en une combinaison de la chaîne sucrée rapportée précédemment pour la dunawithanine C⁸² et l'aglycone rapportée pour dunawithanine F.⁸²

Tableau 43, *Données de RMN ¹H des composés 8, 9, 10, 10a, 11 et 11a, à 300 MHz*

H	8	9	10	10a	11	11a	Ref.124*	H	10	10a	11	11a
1e			4,85 t (2,3)	4,95 t (2,3)	5,01 tl (W _{1,2} =8)	4,91 sl	3,84 (W _{1,2} =7,2)	glucose				
2e	6,20 d (10)	5,95 d (10,3)	2,14 dd (16, 2)		2,18 m	2,12 m		1	4,34 d (7,6)	4,57 d (7)	4,39 d (7,8)	4,38 d (8)
2a			1,75 dd (15, 3)		1,84 tl (13)	1,72 tl (12)		2	3,21 t (8,3)	4,80 dd (8,7, 7)	3,40 t (7,5)	4,85 t (8,2)
3a	6,94 dd (10, 5,8)	6,79 dd (10,5, 4,5)	3,87 m	3,80 m	3,89 m	3,71 m	3,99 octet t	3	3,44 m	5,18 t (9)	3,80 m	3,87 d (8,6)
4e	3,77 d (5,8)	4,63 d (4,5)	2,48 dd (14, 5,5)		2,53 dd (11, 4)	2,36 m		4	3,51 m	3,83 t (9,3)	3,80 m	3,69 t (8,9)
4a			2,27 t (13,3)		2,34 t (11)	2,18 m		5	3,28 m	3,58 m	3,34 m	3,49 ddd (9, 5, 2)
6	3,25 sl (W _{1,2} =5)	5,92 d (4,6)	5,45 dd l (3,4, 1,4)	5,52 dl (3,4, 1,4)	5,54 dl (2,8)	5,48 ml (W _{1,2} =10)	5,58 (W _{1,2} =9,9)	6	3,62 dd (11,9, 4,9)	4,27 dd (11,7, 3,3)	3,80 dd (14,0, 4,0)	4,02 dd (12,1, 5)
7e	2,18 dt (15,2, 3)	2,12 dd (13, 4)	2,00 dd (13,3, 3,3)		2,01 dl (14)	2,03 m		6'	3,73 dd (11,9, 1,7)	4,41 dd (11,7, 2,7)	3,88 dl (14)	4,38 dd (12, 2)
7a	1,25 tl (13)		2,27 t (13,3)		2,35 t (12)			rhamnose		xylose		
8a	1,66 m		1,48 m		1,43 m			1	4,81 d (1,6)	4,80 d (1,6)	4,56 d (6,5)	4,70 d (7,2)
9a			1,52 m		1,44 m	1,46 m		2	3,82 dd (3,2, 1,9)	5,03 m	3,39 m	4,86 dd (9,1, 7,2)
11e			1,55 dd (13,3, 3,3)		1,57 dm (11)	1,57 m		3	3,60 dd (9,3, 3,6)	5,18 dd (9,3, 3,3)	3,34 m	5,12 t (9,1)
11a			1,30 t (13,3)		1,40 t (12)	1,38 m		4	3,39 t (9,5)	5,06 t (9,3)	3,52 m	4,99 ddd (9,1, 7, 5)
12a			4,57 dd (10,3, 4)	4,63 dd (10,3, 4)	3,79 dd (11,2, 2)	4,61 dd (10, 5)		5	3,83 qd (9,4, 6,6)	3,83 m	3,25 dd (12,1, 10)	3,42 dd (12,3, 7,1)
14a			1,05 m		1,08 m			6	1,26 d (6,1)	1,16 d (6)		
17a			1,75 m		1,88 m	1,74 m		5'			3,98 dd (11,5, 4,5)	4,28 dd (12,2, 4,9)
18	4,15 d (11,6)	4,21 d (11,8)	0,91 s	0,98 s	0,81 s	0,96 s	0,87 s				xylose'	
18'	4,11 d (11,5)	4,16 d (11,6)						1			4,84 m (W _{1,2} =8)	4,59 d (6,2)
19	1,40 s	1,44 s	1,03 s	1,06 s	1,09 s	1,03 s	1,03 s	2			3,44 m	4,92 dd (8,8, 6)
21	1,38 s	1,42 s	1,18 s	1,26 s	1,20 s	1,24 s	1,25 s	3			3,44 m	5,13 t (8,5)
22a	4,25 dd (13,3, 3,6)	4,25 dd (13,3, 3,6)	4,36 dd (13,3, 3,5)	4,31 dd (13,3, 3,5)	4,68 dd (13,2, 3)	4,32 dd (13, 3,4)	4,23 dd (13, 3,6)	4			3,56 m	4,97 td (9, 4)
23e	2,08 dl (16)	2,11 dd (16, 2)	2,09 dd (16,6, 4)		2,22 dd (14, 3)	2,02 m		5			3,34 dd (11,5, 12)	3,33 dd (12, 8,7)
23a	2,40 tl (16)	2,40 tl (16)	2,45 t (16,6)		2,63 tl (14)	2,39 t (15)		5'			4,06 dd (12,1, 5,1)	4,21 dd (11,7, 5,3)
27	1,89 s	1,89 s	1,81 s	1,88 s	1,87 sl	1,87 s	1,88 s					
28	1,95 s	1,96 s	1,91 s	1,93 s	1,97 sl	1,92 s	1,96 s					
C ₁ OAc			2,02 s		2,05 s							
C ₁₂ OAc			1,91 s									
C ₁₈ OAc	2,05 s	2,06 s										

8, 9, 10a et 11a dans CDCl₃, 10 dans CDCl₃-CD₃OD 9:1, 11 dans CD₃OD

Constantes de couplage (J) en Hz

* Dunawithagénine

Tableau 44. Données de RMN ^{13}C des composés **8**, **9**, **10**, **11** et **11a**, à 75,0 MHz

C	8	9	10	11	11a ref.124†	C	10	11	11a
1	202,3	203,5	75,4	75,0	74,4	72,9			
2	132,1	129,0	33,8	33,2	33,6	38,3			
3	142,0	142,9	73,8	73,4	74,5*	66,3	1	101,1	100,6
4	69,8	69,4	37,9	37,4	38,1	41,4	2	73,6	73,5
5	63,8	139,0	137,0	136,5	136,9	137,6	3	75,6	72,0
6	62,5	130,5	124,6	124,2	124,1	125,2	4	79,1	75,4
7	31,5	31,1	31,4	30,8	31,2	31,7	5	75,2	77,1
8	29,6	32,5	30,3	30,2	30,0	31,3	6	61,1	60,5
9	44,2	42,9	41,0	41,2	40,8	41,5			
10	48,0	49,3	40,5	40,3	40,2	41,7			
11	22,1	22,8	27,0	28,2	29,6	20,2			
12	34,9	35,1	81,0	79,7	80,2	39,8			
13	45,2	45,4	47,2	47,6	47,2	43,0			
14	56,2	56,4	56,1	54,9	56,0	56,8			
15	23,6	23,7	23,4	24,1	23,3	23,9			
16	21,8	21,7	23,3	22,8	23,2	22,0			
17	54,9	54,9	55,2	61,4	55,1	54,7			
18	61,7	61,9	10,1	8,3	9,9	13,6			
19	17,6	22,8	19,3	19,0	19,2	19,4			
20	74,7	74,8	74,9	73,9	74,8	75,2			
21	21,2	21,2	21,0	23,8	21,5	20,8			
22	80,0	80,9	81,2	78,4	80,6	81,0			
23	31,3	31,6	31,5	32,6	31,2	31,5			
24	149,0	148,5	150,5	150,3	148,6	149,1			
25	122,0	122,1	121,7	121,2	122,0	122,0			
26	166,0	165,8	167,3	167,3	165,8	166,2			
27	12,3	12,5	12,3	11,9	12,4	12,5			
28	20,5	20,6	20,6	20,2	nd	20,5			
C ₁ OAc			171,1	170,5	170,2				
C ₁ OAc			21,0	20,7	nd				
C ₁₂ OAc			170,6		170,0				
C ₁₂ OAc			21,7		21,6				
C ₁₈ OAc	171,0	171,1							
C ₁₈ OAc	20,4	21,2							

8, **9** et **11a** dans CDCl_3 , **10** dans $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ 9:1,

Déplacements chimiques en ppm à partir des signaux des solvants deutérés (77,0 ppm du CDCl_3 pour **8**, **9**, **10** et **11a**, et 49,0 ppm du CD_3OD pour **11**)

*Valeurs en pouvant être interverties

† Dunawithagénine

nd: non déterminé

Tableau 45. *Corrélations HMBC et ROESY pour la dunawithanine G (10)*

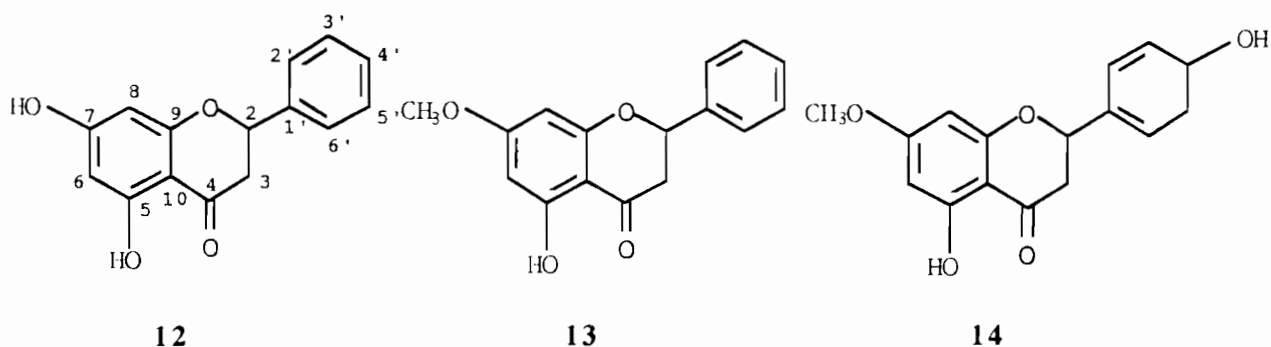
H	Corrélation HMBC	Corrélation ROESY
1	C-5, C-10, (MeC=O)OC ₁	H-2e, H-2a, H-11e, H-19
2e		H-1, H-2a, H-4e,
2a		H-19, H-4a, H-2e
3		H-4a, H-4e, H-1 glu
4e	C-2, C-3, C-5, C-6, C-10	H-3, H-4a, H-6
4a		H-2a, H-19
6	C-4, C-8, C-10	H-4e, H-7e
7		H-6
11e		H-11a, H-1
11a		H-11e
12	C-13, C-17, C-18, (MeC=O)OC ₁₂	
16a		H-21
18	C-12, C-13, C-14, C-17	H-2a
19	C-1, C-5, C-9, C-10	H-1, H-2a, H-4a
21	C-17, C-20, C-22	H-16a
22	C-26	
23e		H-23a
27	C-24, C-25, C-26	
28	C-23, C-24, C-25	
C ₁ OAc	(MeC=O)OC ₁	
C ₁₂ OAc	(MeC=O)OC ₁₂	
Glucose		
1	C-3, C-2 glu, C-5 glu	H-3, H-2 glu, H-3 glu, H-5 glu
2	C-1 glu	H-4 glu, H-1 glu
3		H-1 glu, H-1 rha
4	C-1 rha	H-1 rha, H-2 glu
5		H-1 glu
6		H-6' glu
6'		H-6 glu
Rhamnose		
1	C-2 rha, C-3 rha, C-5 rha	H-3 glu, H-4 glu, H-2 rha
2		H-1 rha, H-4 rha
3		H-4 rha, H-5 rha
4	C-5 (rha), C-6 (rha)	H-2 rha, H-3 rha, H-6 rha
5	C-4 (rha)	H-3 rha, H-6 rha
6		H-4 rha, H-5 rha

IV.7.Détermination de structure des composés de *Notholaena nivea* var. *flava*

Cette espèce réputée chez les raqaypampeños pour son utilisation dans les maladies pulmonaires et qui a été évaluée dans ce travail pour son activité antifongique, contient des aglycones flavonoïdiques identifiées comme trois flavanones (12, 13, 14), et une dehydrochalcone (15).

IV.7.1.Composés 12, 13 et 14

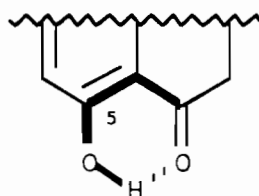
Du fait de la similitude structurale de ces composés de structures connues, leur analyse spectrale a été abordée de manière conjointe.



Le composé **12** est connu sous le nom de: pinocembrine;¹²⁷ le composé **13** sous le nom de pinostrobin¹²⁸ et le composé **14** est le 7-O-méthyl-naringénine ou sakuranetine.¹²⁹

IV.7.1.1.Analyse des spectres de RMN

Le premier signal qui attire l'attention dans les spectres RMN ¹H de ces trois composés (Tableau 46) est un fin singulet à δ 12,06 (**12**), 12,04 (**13**) et 12,02 (**14**) ppm (toutes les données de déplacements chimiques ou de constantes de couplage seront désormais décrites dans l'ordre **12**, **13** et **14**). Ce signal a été attribué à un proton phénolique participant à une liaison hydrogène (O-H----O=C) plutôt qu'un proton d'aldéhyde, du fait de l'absence de tache de corrélation dans le spectre de corrélation directe XH CORR, entre ce proton et un carbonyle. L'existence de ce proton chélaté, laisse envisager la présence d'un substituant OH en position *peri* du carbonyle.



La nature 2-phénylchromanone des structures des composés **12**, **13** et **14** est déduite de l'analyse des spectres de RMN ^1H .

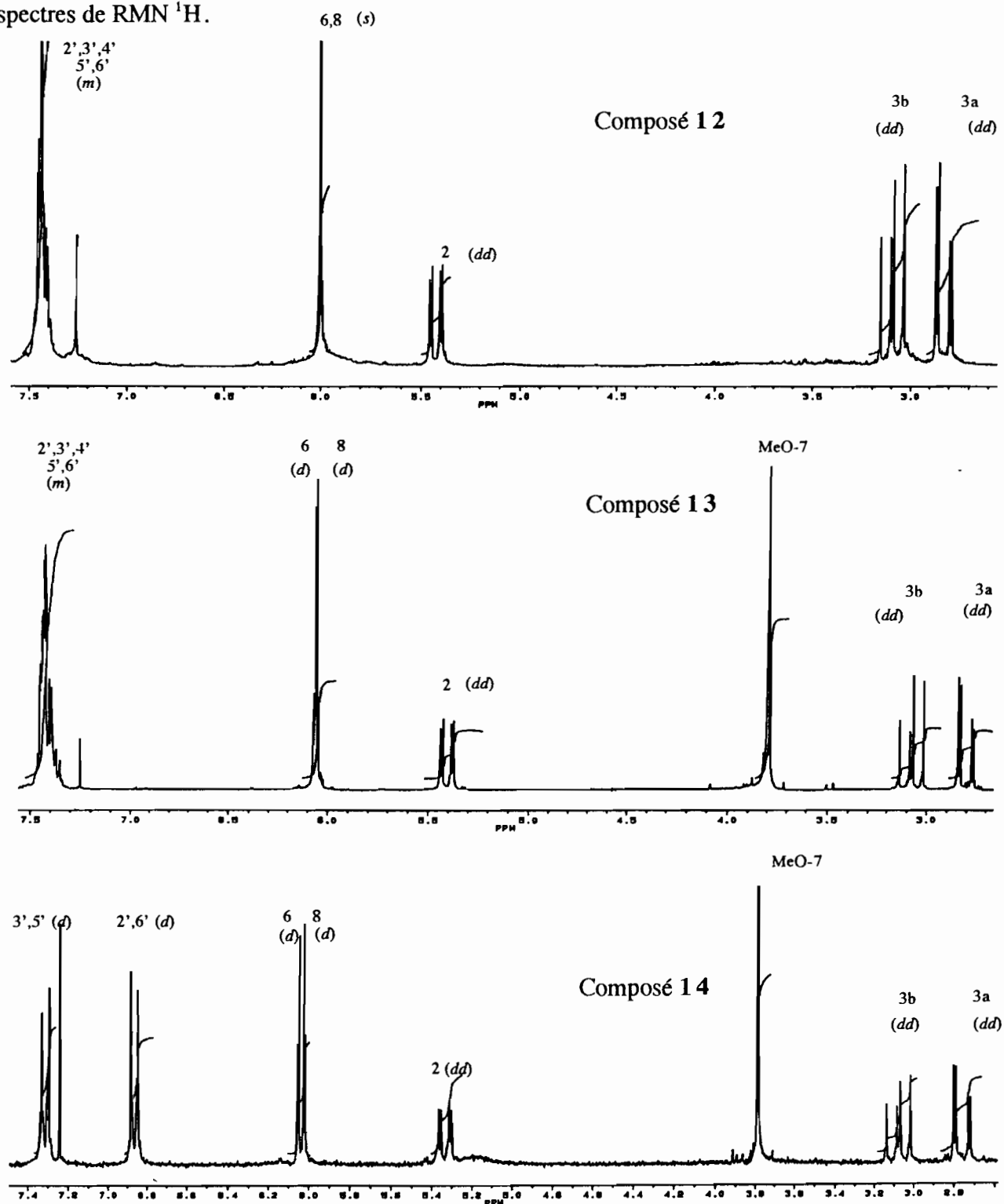


Figure 69. Spectres de RMN ^1H des composés **12**, **13** et **14** (250 MHz)

Dans la zone de protons aromatiques, les composés **12** et **13** (Figure 69) présentent un système benzénique monosubstitué non analysable s'en intégrant pour 5 protons centré à δ 7,43 et 7,42, tandis que le composé **14** (Figure 69) présente deux doublets (δ 7,34 et 6,89) qui s'intègrent pour deux protons chacun, caractéristiques d'un noyau benzénique *para*-disubstitué (système AA'BB').

Toujours dans la zone des résonances aromatiques, ces trois composés présentent un second système benzénique tétrasubstitué par la présence d'un singulet de deux protons chimiquement équivalents à δ 6,02 pour **12** et de deux fins doublets ($J = 2,3$ Hz) centrés à δ 6,09 et 6,07 dans **13** et δ 6,09 et 6,04 dans **14** du fait du couplage 4J de protons positionnés en *meta*. Dans la zone des protons portés par des carbones oxygénés, un doublet de doublets indique un proton geminé au phényle du noyau 2-phénylchromanone, δ 5,42 ou 5,41 ($J = 12,9$ et 3,2 ou 3,1 Hz) **12** ou **13** et δ 5,36 ($J = 13,0$ et 3,3 Hz) **14**. Ce signal est couplé avec les deux protons méthyléniques H-3 du noyau 2-phénylchromanone pour former un système de couplage de spins ABX. La partie AB du système apparaît comme deux doublets de doublets, δ 3,10 et 2,83 (**12**), ou δ 3,10 et 2,82 (**13**) ou δ 3,10 et 2,79 (**14**).

Le singulet observé pour H-6 et H-8 dans le composé **12** contre les doublets dans **13** et **14**, indique que les substituants en C-7 et C-5 sont de la même nature pour **12** et de nature différente dans **13** et **14**; en effet en ces positions sont présents deux hydroxyles pour **12** au lieu d'un méthoxyle (δ 3,81 et 3,82) et d'un hydroxyle dans le cas des composés **13** et **14**.

Les spectres de RMN ^{13}C analysés de l'expérience DEPT (Figure 70, Tableau 46), présentent une grande similitude dans le cas de composés **12** et **13**, en particulier pour C-2 (δ 79,2), C-3 (δ 43,3), C-1' (δ 138,3 ou 138,4), C-3'/C-4'/C-5' (δ 128,9), et C-2'/C-6' (δ 126,1), ce qui montre que le morceau [phényle-C₍₂₎-C₍₃₎] du noyau 2-phénylchromanone est identique. La différence la plus importante se manifeste sur le C-7 de **12** (δ 164,5) qui se trouve plus déblindé dans le composé **13** (δ 168,0) du fait de la présence d'un méthoxyle au lieu de l'hydroxyle. Par contre entre **13** et **14** les résonances de C-7 (δ 168,0), C-5 (δ 164,1) et C-9 (δ 162,8 ou 162,9) sont identiques, ce qui va dans le sens de la même substitution pour le cycle benzénique A dans ces deux produits.

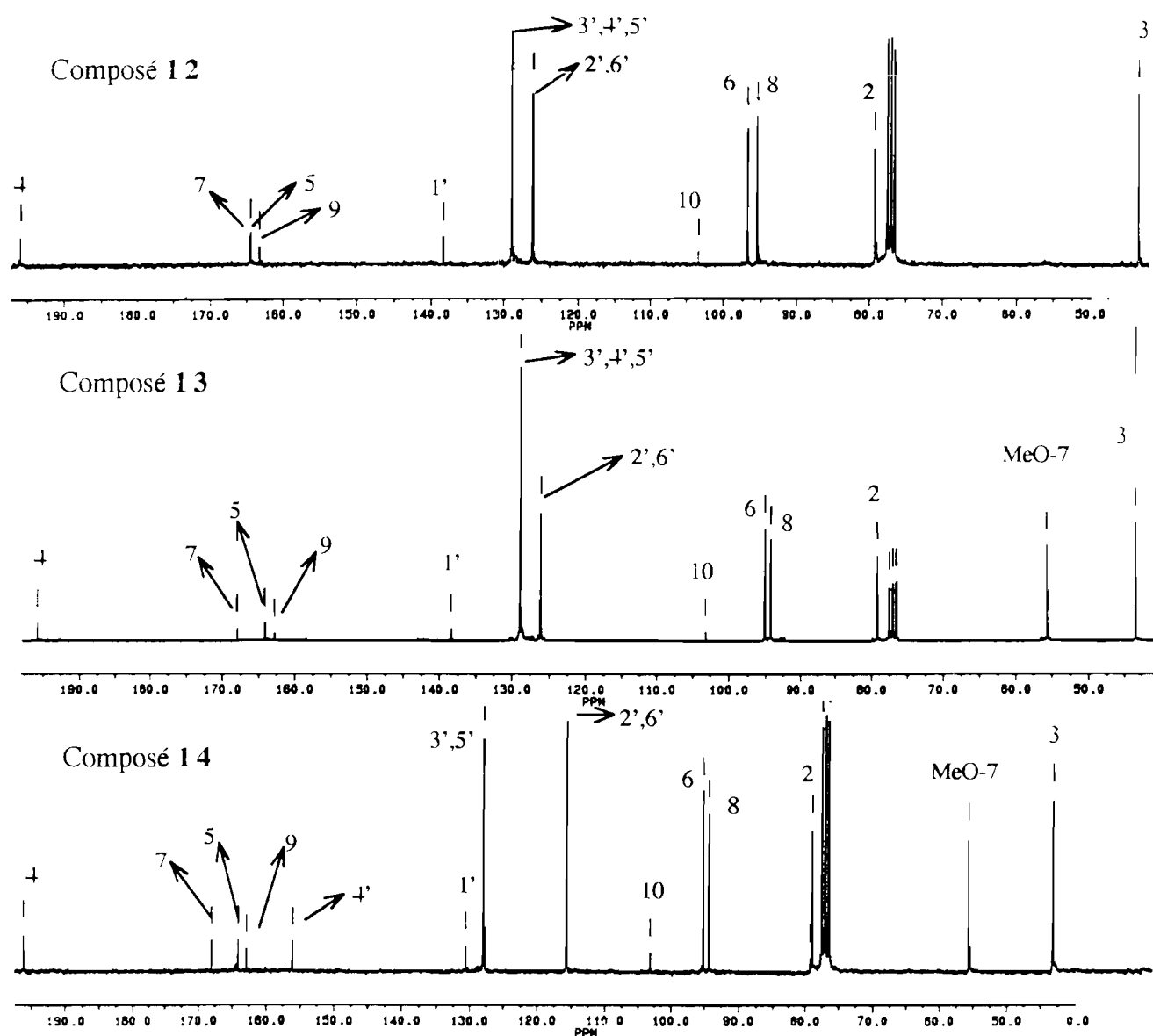


Figure 70. Spectres de RMN ^{13}C des composés 12, 13 et 14 (62,9 MHz)

Des expériences COSY réalisées sur ces trois produits ont confirmé la présence des trois systèmes de spins du squelette flavanone. L'analyse des corrélations hétéronucléaires distantes (COLOC) ont confirmé la proposition des substitutions déjà suggérées d'après l'analyse précédente dans le cas des produits 13 et 14 (Figure 71).

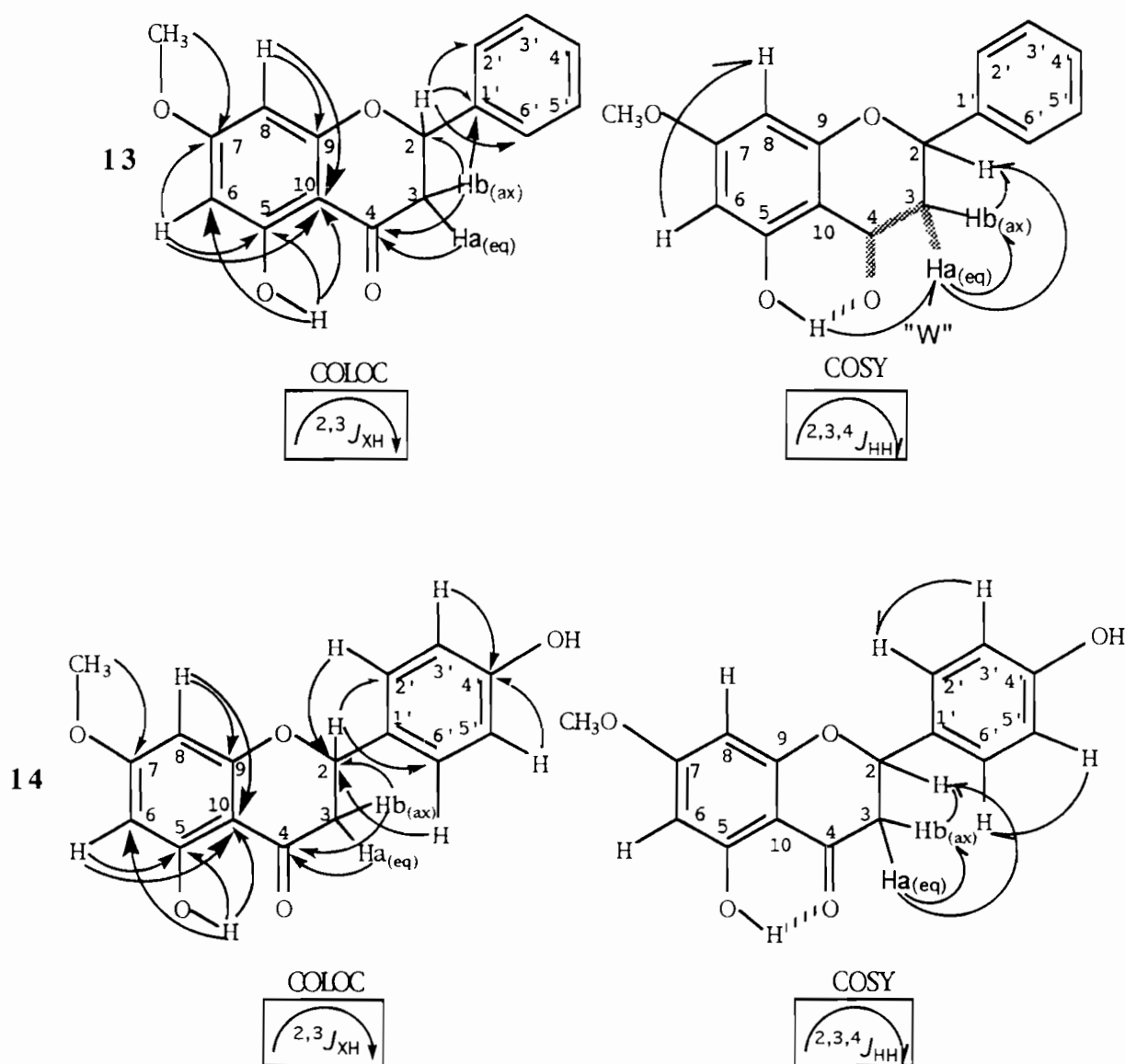


Figure 71. Corrélations homo- et hétéronucléaires pour les composés 13 et 14

IV.7.1.2. Analyse des spectres de masse d'impact électronique

Les spectres de masse en IE des composés 12, 13 (Figure 72) et 14 (Figure 73) confirment les masses moléculaires par les ions à m/z 256 (12), 270 (13) et 286 (14) qui correspondent aux formules brutes en $C_{15}H_{12}O_4$ (12), en $C_{16}H_{14}O_4$ (13) et en $C_{16}H_{14}O_5$ (14). A partir de l'ion moléculaire, une déshydratation ($[M]^+ - H_2O$) conduit au fragment à m/z 238 (12) ou 252 (13) ou

268 (14). La perte du radical phényl ($[M]^+ - C_6H_5$) est évidente par le fragment intense à m/z 179 (12) ou à 193 (13) et m/z 77 (12 et 13). Le pic à m/z 91 (12 et 13) ou ion tropylium, confirme le noyau benzénique substitué par un alkyle.

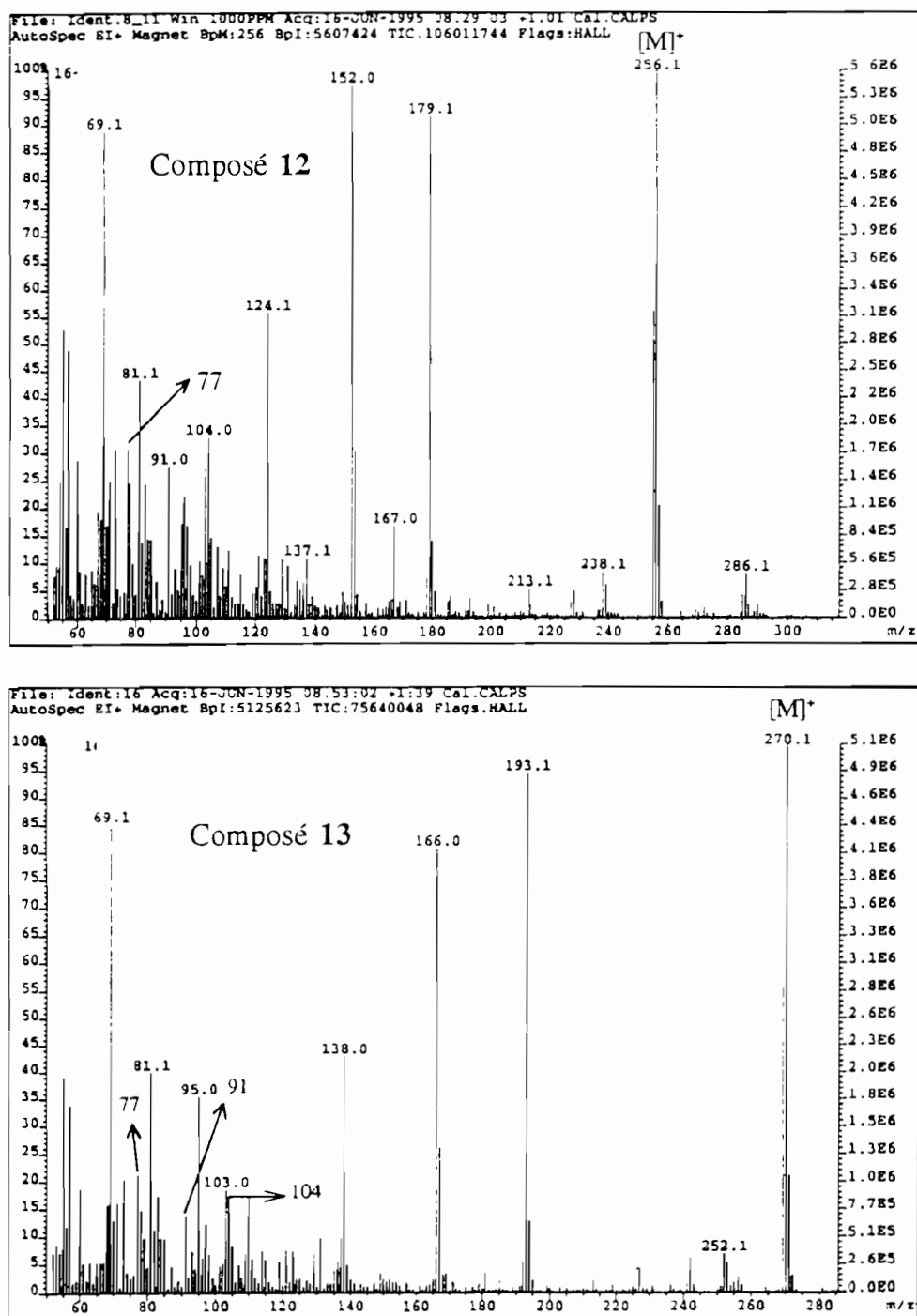


Figure 72. Spectres de masse d'impact électronique des composés 12 et 13

Les ions les plus intenses du spectre correspondent à ceux obtenus selon la fragmentation usuelle des flavonoïdes en particulier celle des flavanones¹³⁰ selon un mécanisme de type retro-Diels-Alder dans le cycle dihydro- γ -pyrone (Schéma 21).

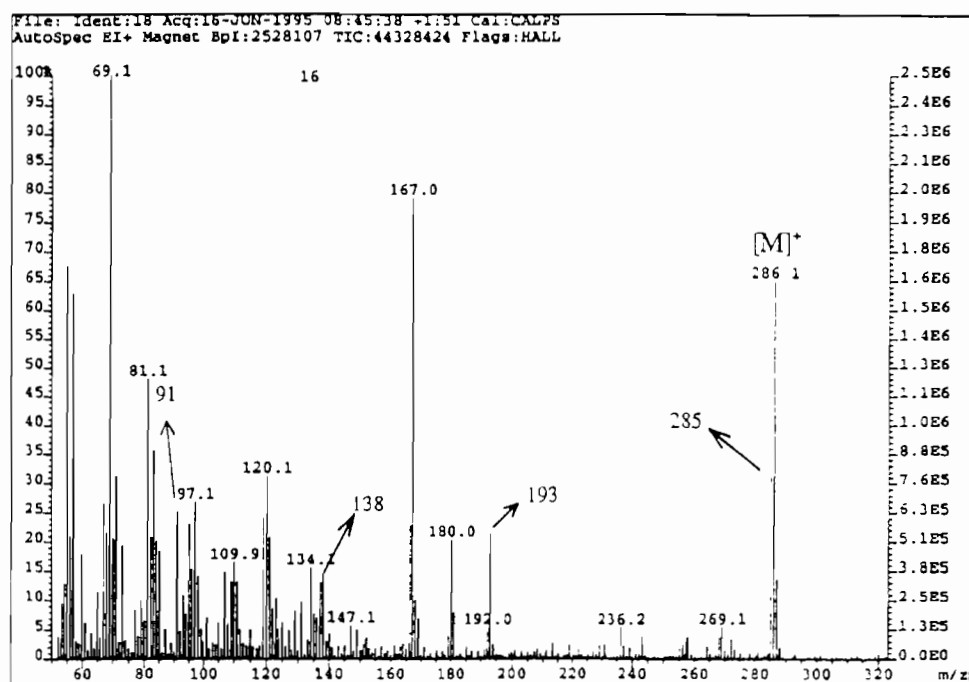


Figure 73. Spectre de masse d'impact électronique du composé 14

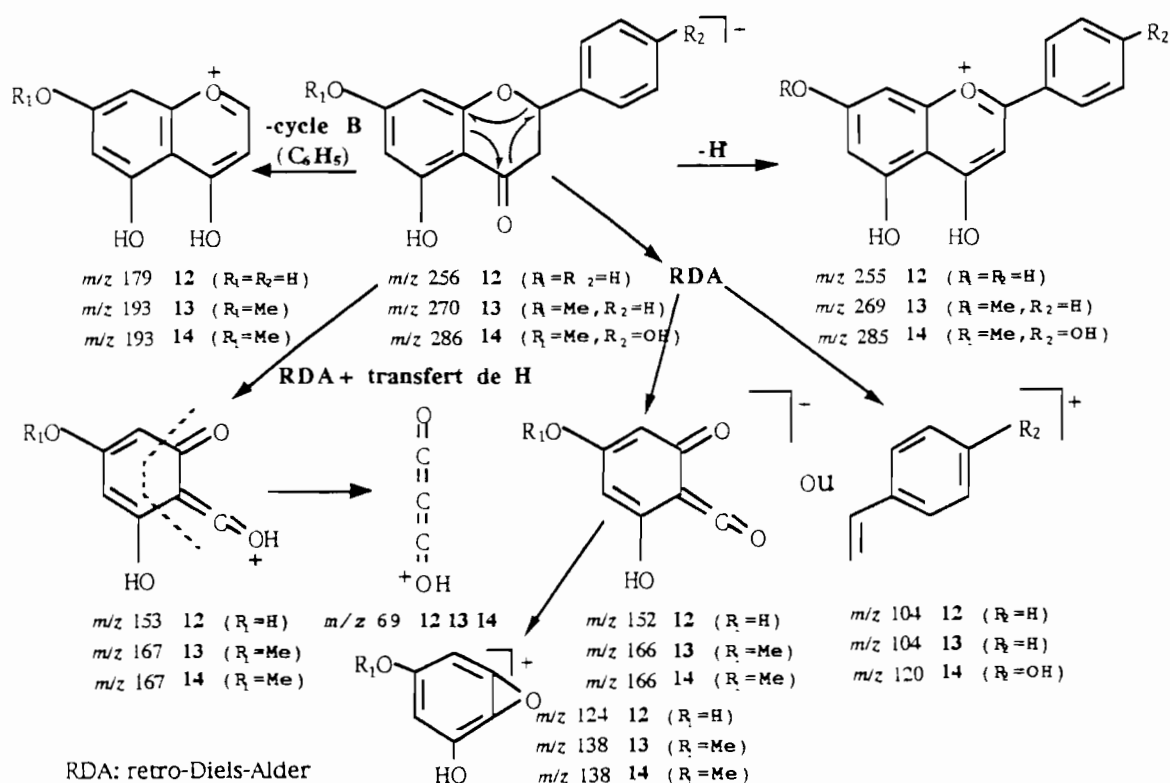
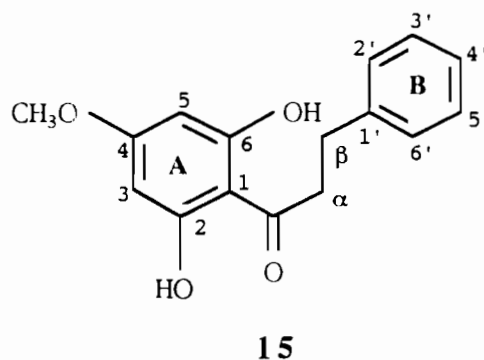


Schéma 21. Fragmentations de spectrométrie de masse des composés 12, 13 et 14

La stéréochimie des flavanones naturelles est définie par le centre d'asymétrie C-2. Le substituant phényle peut être placé de manière à définir une configuration $2S$ en indiquant le groupe phényle placé au-dessous du plan de la molécule (α), ou $2R$ avec ce groupe positionné en β du plan moléculaire. La configuration $2S$ (α) est considérée comme la configuration naturelle.¹³¹ Nous n'avons pas pu réaliser des mesures d'activité optique ($[\alpha]_D$) sur les composés **12**, **13** et **14** pour envisager une distribution égalitaire ou différente des possibles énantiomères.

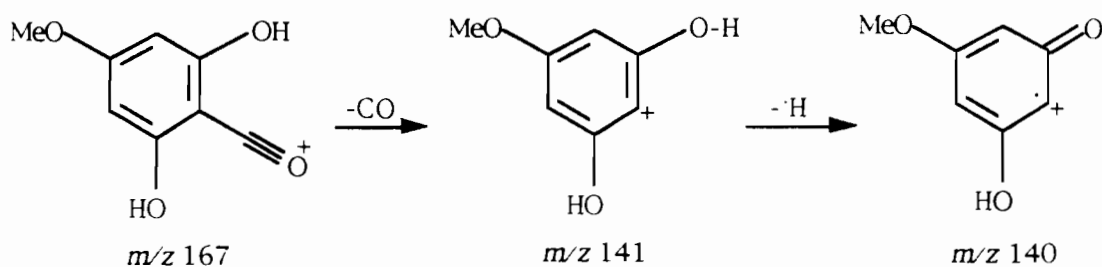
IV.7.2.Composé 15

A part les flavanones **12**, **13** et **14**, précédemment décrites, un chalconoïde, la 2,6-dihydroxy-4-méthoxy-dihydrochalcone, composé **15**¹²⁸ a été isolé. Pour faciliter la description des données de RMN, une numérotation proche à celle des flavanones a été adoptée à la place de la numérotation conventionnelle des chalcones. Cette nouvelle numérotation nous paraît plus logique vis-à-vis de leur route biogénétique commune. Les numéros des carbones du cycle A deviennent sans élision alors que ceux du cycle B portent une apostrophe.



IV.7.2.1.Analyse du spectre de masse d'impact électronique

Le pic moléculaire apparaît à m/z 272 (Figure 74) analysé pour une formule brute en $C_{16}H_{16}O_4$. Le fragment à m/z 255 correspond au fragment $[M - OH]^+$. Le fragment intense à m/z 167 traduit la scission de la liaison du carbonyle avec la partie phényl propanoïde.



La coupure de la liaison du carbonyle avec le cycle phloroglucinol (2,6-dihydroxy-4-methoxy) conduit au fragment à m/z 105 après perte du CO.

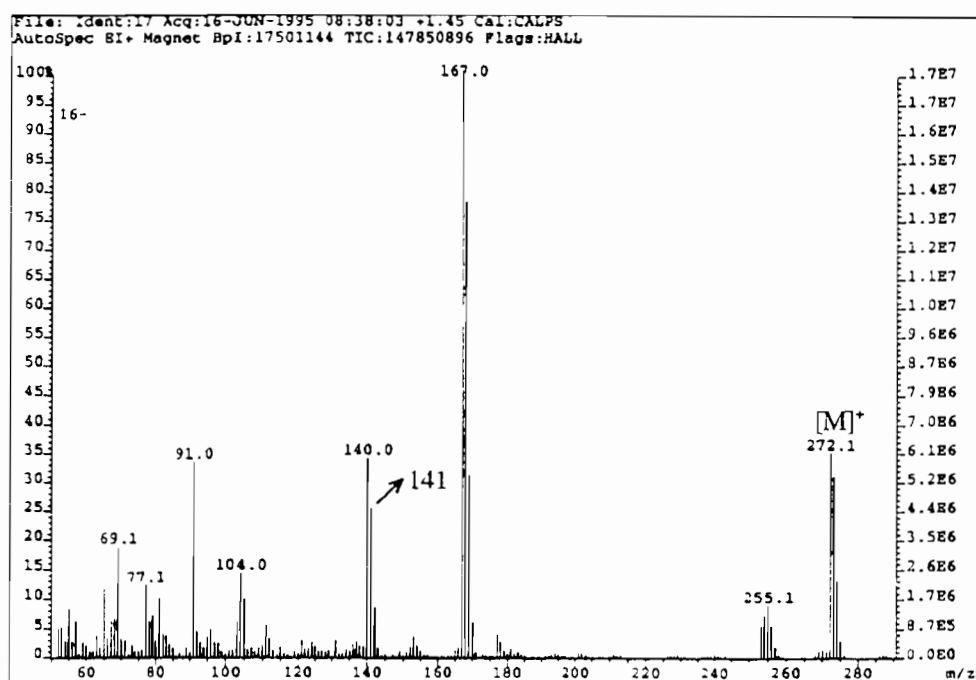
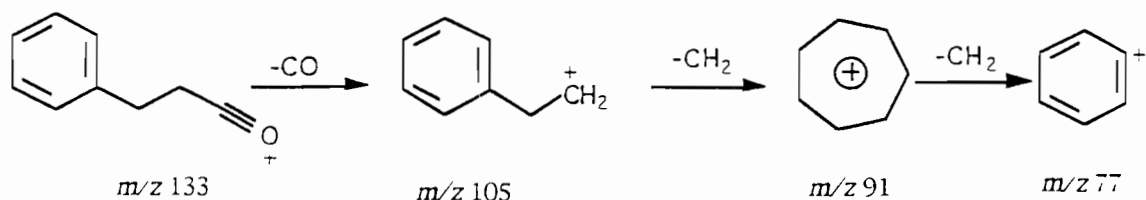


Figure 74. Spectre de masse d'impact électronique du composé 15

IV.7.3. Analyse des spectres de RMN du composé 15

Le spectre de RMN ^1H de 15 (Figure 75, Tableau 46) présente un massif de multiplets centré entre δ 7,35 et 7,14 s'intégrant pour cinq protons aromatiques qui caractérise un noyau benzénique monosubstitué. Deux protons aromatiques isolés et chimiquement équivalents peuvent être attribués au singulet à δ 5,93. Le singulet de trois protons à δ 3,75 correspond à un méthoxyle et peut être placé comme substituant d'un noyau aromatique. Les deux sextets restants correspondent au système de spins de deux protons couplés caractérisés par des triplets à δ 3,40 ($J = 7,2$ Hz) et 3,00 ($J = 7,3$ Hz). D'après leur déplacements chimiques, il s'agit de méthylènes adjacents à des carbones insaturés: le carbonyle et le cycle benzénique.

Le spectre de RMN ^{13}C (Tableau 46) combiné à la séquence DEPT montre les signaux du cycle benzénique monosubstitué à δ 128,4 et 128,3 pour les carbones magnétiquement équivalents C-2'/C-6' et C-3'/C-5', et le C-4' à δ 125,8. Les carbones magnétiquement équivalents C-3/C-5 appartenant au deuxième noyau aromatique, résonnent à δ 93,7. Restent trois autres éléments, à savoir le méthoxyle à δ 55,3 et le système des méthylènes en α et β du carbonyle à δ 45,5 et 30,6. Le restant des signaux est constitué de carbones quaternaires dont un carbonyle à δ 204,9. Par des expériences de RMN 2D de corrélation hétéronucléaire directe (XHCORR) et distantes (COLOC) les carbones quaternaires aromatiques des deux cycles benzéniques ont été attribués (Figure 76).

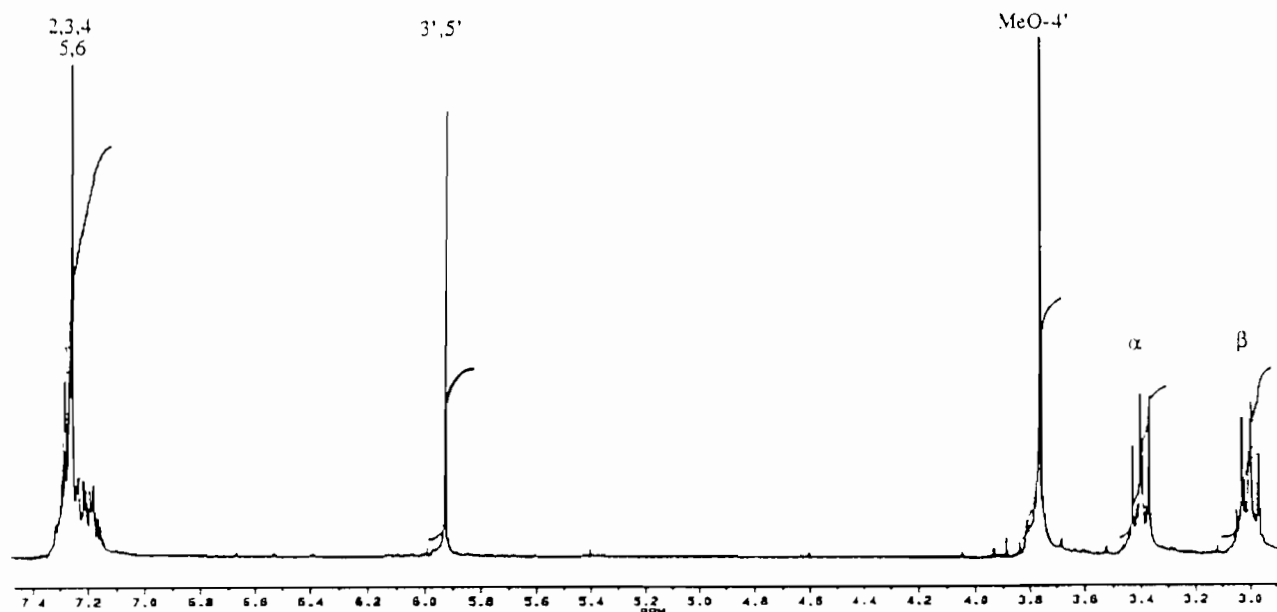
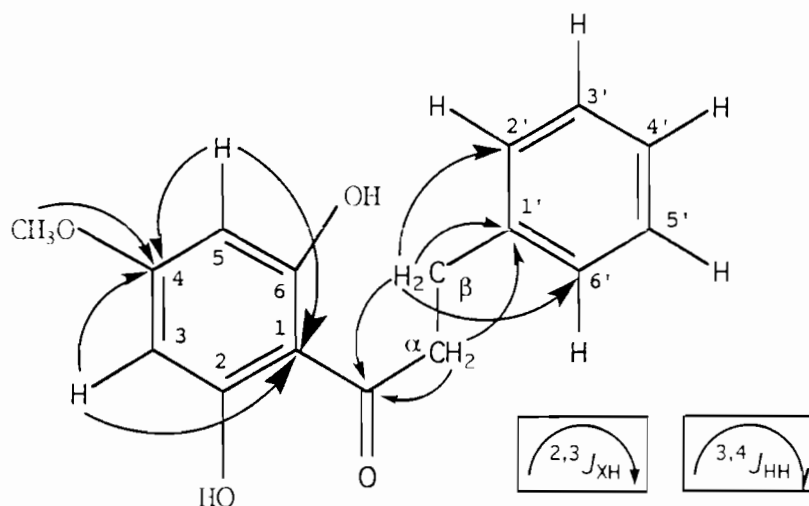


Figure 75. Spectre de RMN ^1H (250 MHz) du composé 15

Les données spectrales de δ de RMN ^1H et ^{13}C de la chalcone 15 sont identiques à celles reportées dans la littérature¹²⁸ pour la 2,6-dihydroxy-4-méthoxydihydrochalcone. Il semble donc possible d'envisager de placer le méthoxy sur le C-4 du phloroglucinol puisque les C-3 et C-5 ont le même déplacement chimique, bien qu'aucune corrélation $^2J_{\text{HC}}$ ou $^3J_{\text{HC}}$ ne puisse confirmer cette hypothèse et ne permet pas d'exclure de placer le méthoxy sur le C-2. Dans l'hypothèse du méthoxy en C-4, les corrélations hétéronucléaires: MeO-4 $\rightarrow$ C-4 et H-3/H-5 $\rightarrow$ C-4 permettent d'identifier les résonances des carbones quaternaires C-4 et C-2/C-6 respectivement à δ 165,6 et 163,8 contrairement à ce qui avait été attribué dans la littérature¹²⁸ (C-4 à δ 163,7 et C-2/C-6 à δ 165,7). La constante de couplage entre les CH_2 , H- α , et H- β , reportée comme étant de 3 Hz,¹²⁸ doit être corrigée à sa vraie valeur de 7,4 Hz mesurée pour le composé 15.



15

Figure 76. Corrélations hétéronucléaires pour le composé 15

Tableau 46. Données de RMN, 250 MHz (^1H) et 62,9 MHz (^{13}C) des composés 12, 13, 14 et 15

Atome	12 ^1H	13 ^1H	14 ^1H	Atome	12 ^{13}C	13 ^{13}C	14 ^{13}C	Atome	15 ^{13}C	15 ^1H
2	5,42 <i>dd</i> (12,9, 3,1)	5,41 <i>dd</i> (12,9, 3,2)	5,36 <i>dd</i> (13,0, 3,3)	2	79,2	79,2	79,0	1	105,0	-
3a	2,83 <i>dd</i> (17,2, 12,9)	2,82 <i>dd</i> (17,2, 12,9)	2,79 <i>dd</i> (17,2, 13,0)	3	43,3	43,3	43,2	2	163,8	-
3b	3,10 <i>dd</i> (17,2, 12,9)	3,10 <i>dd</i> (17,2, 12,9)	3,10 <i>dd</i> (17,2, 13,0)	4	185,8	195,8	196,1	3	93,7	5,93 <i>s</i>
6	6,02 <i>s</i>	6,09 <i>d</i> (2,3)	6,09 <i>d</i> (2,3)	5	164,4	164,1	164,1	4	165,6	-
8	6,02 <i>s</i>	6,07 <i>d</i> (2,3)	6,04 <i>d</i> (2,3)	6	96,8	95,1	95,1	5	93,7	5,93 <i>s</i>
OH-5	12,06 <i>s</i>	12,04 <i>s</i>	12,02 <i>s</i>	7	164,5	168,0	168,0	6	163,8	-
MeO-7	-	3,81 <i>s</i>	3,82 <i>s</i>	8	95,5	94,3	94,3	MeO-4	55,3	3,78 <i>s</i>
2'	7,43 <i>m</i>	7,42 <i>m</i>	6,89 <i>d</i> (8,9)	9	163,2	162,8	162,9	C=O	204,9	-
3'	7,43 <i>m</i>	7,42 <i>m</i>	7,34 <i>d</i> (8,5)	10	103,2	103,1	103,1	α	45,5	3,40 <i>t</i> (7,2)
4'	7,43 <i>m</i>	7,42 <i>m</i>	-	MeO-7	-	55,7	55,7	β	30,6	3,00 <i>t</i> (7,3)
5'	7,43 <i>m</i>	7,42 <i>m</i>	7,34 <i>d</i> (8,5)	1'	138,3	138,4	130,6	1'	141,8	-
6'	7,43 <i>m</i>	7,42 <i>m</i>	6,89 <i>d</i> (8,9)	2'	126,1	126,1	115,7	2'	128,4	7,24 <i>m</i>
MeO-4'	-	-	-	3'	128,9	130,1	128,0	3'	128,3	7,24 <i>m</i>
				4'	128,9	130,1	128,0	4'	125,8	7,24 <i>m</i>
				5'	128,9	130,1	128,0	5'	128,3	7,24 <i>m</i>
				6'	126,1	126,1	115,7	6'	128,4	7,24 <i>m</i>

IV.8.Détermination de structure des composés de *Cavanillesia aff. hylogeiton*

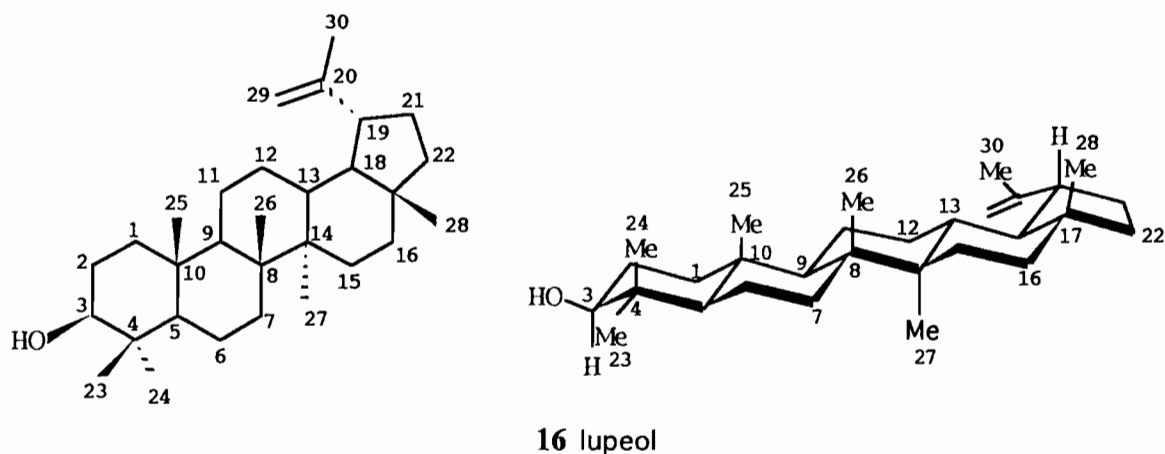
La recherche des composés responsables de l'activité antipaludique des extraits et fractions de *C. aff. hylogeiton*, a conduit à l'isolement et l'identification structurale de quatre composés terpéniques, et d'un mélange de composés lipidiques.

Trois types de produits gras, qui comportent des enchaînements hydrocarbonés saturés ou au moins avec une insaturation ont été détectés dans les écorces de *C. aff. hylogeiton*. Dans tous les cas ces produits sont apparus comme des mélanges comme cela a été constaté par les spectres de masse d'impact électronique.

Les résultats négatifs des essais antipaludiques obtenus sur ces fractions contenant des mélanges d'acides gras ou des glycerides, nous ont poussé à abandonner la purification de ces produits. Une telle purification nécessitait l'utilisation de techniques chromatographiques et de spectrométrie de masse particulières différentes de celles couramment employées dans notre recherche.

IV.8.1.Composés 16, 17, 18 et 19

L'analyse des spectres de RMN ^1H (Figure 77, Tableau 47) et de RMN ^{13}C (Tableau 47) du composé **16** a permis de l'identifier au lupéol¹³²



Son spectre de RMN ^1H révèle la présence d'une double liaison exocyclique disubstituée représentée par deux fins doublets ($J = 2$ Hz) de protons géminés à 4,59 et 4,71 ppm. Un proton d'alcool

secondaire H-3 apparaît à δ 3,20 sous la forme d'un doublet de doublets ($J = 10,6$ et $4,8$ Hz). Le proton allylique H-19 apparaît déblindé à δ 2,40 comme un triplet de doublets ($J = 16,4$ et $5,3$ Hz).

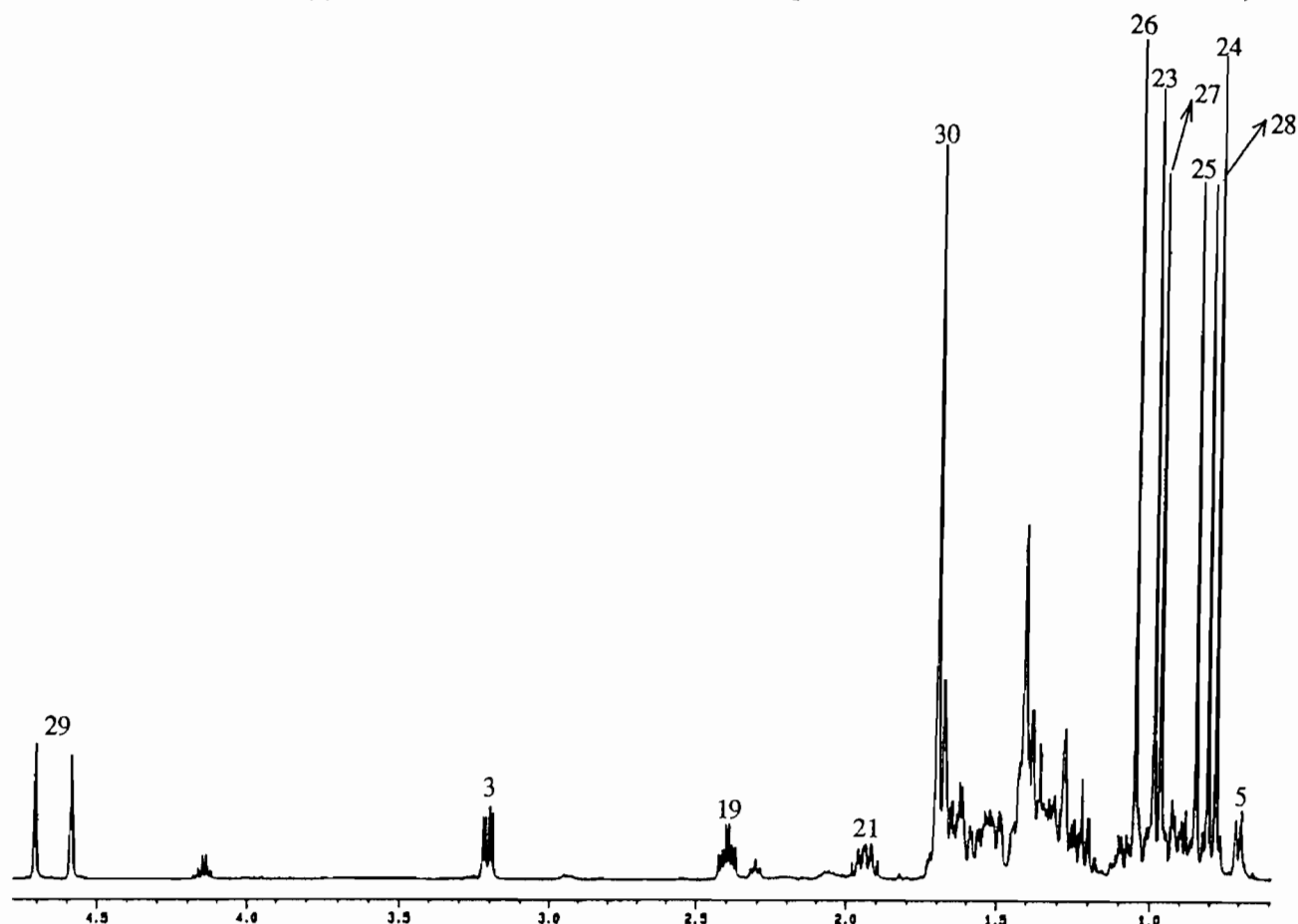


Figure 77. Spectre de RMN ^1H du composé **16** (500 MHz)

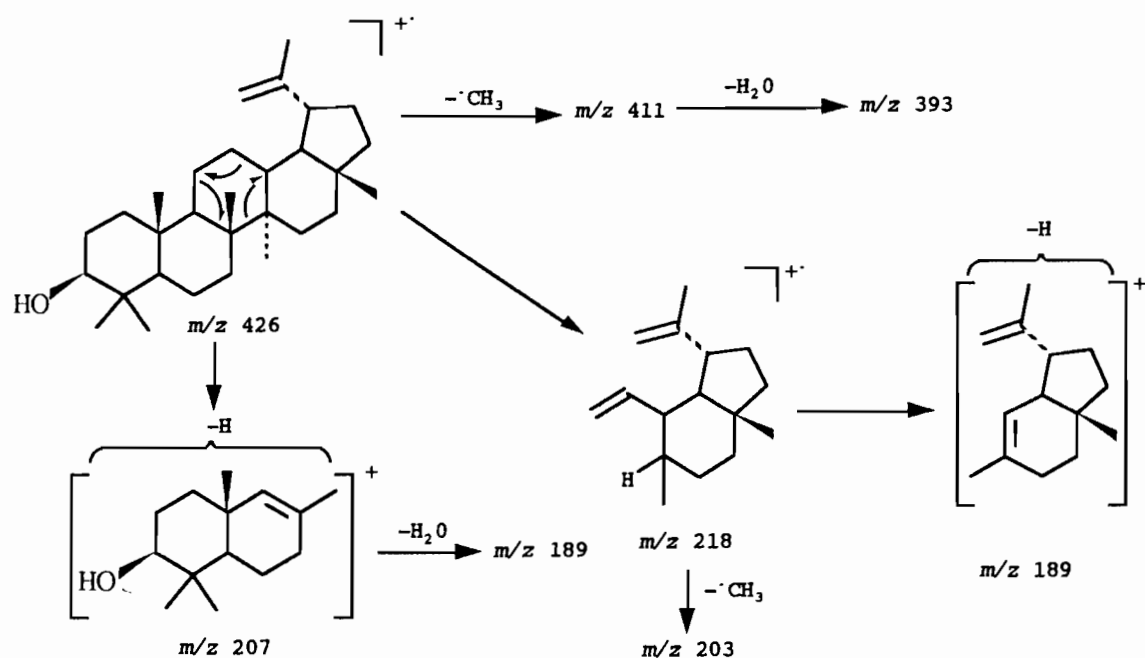
Un groupe méthylique placé sur un quaternaire sp^2 (s, H-30), résonne à δ 1,69. Six autres groupes méthyles angulaires ont été attribués d'après l'expérience XHCORR comme H-26 (δ 1,04), H-23 (δ 0,99), H-27 (δ 0,97), H-25 (δ 0,85), H-28 (δ 0,81) et H-24 (δ 0,79). L'expérience DEPT, signale l'existence de quatre carbones quaternaires en jonction de cycles C-10 (δ 37,1), C-8 (δ 40,8), C-14 (δ 42,8) et C-17 (δ 43,0), en plus du C-4 (δ 38,7) et du quaternaire sp^2 C-20 (δ 150,9) de la chaîne latérale. Le Tableau 47 résume les données de RMN du composé **16**.

L'analyse du spectre de masse d'impact électronique (Figure 78) corrobore également l'attribution structurale du lup-20(29)-en-3- β -ol (lupéol) pour **16**, avec un ion moléculaire à m/z 426 et analysé pour $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$. Le Schéma 22 reprend les principales fragmentations observées en se reportant à celles décrites dans la littérature.¹³³

Tableau 47. Données de RMN du lupéol **16**¹³² dans CDCl₃, 500 MHz (¹H), 62,9 MHz (¹³C)

Atome	16 ¹³ C	ref. 132	16 ¹ H	ref. 132	Atome	16 ¹³ C	ref. 132	16 ¹ H	ref. 132
1	38,8	38,7	1,7 0,9		16	35,6	35,5	1,49 1,43	
2	27,4	27,4	1,73		17	43,0	42,9	-	
3	79,0	78,8	3,20 <i>dt</i>	3,25	18	48,3	48,2	1,36	
			(10,6, 4,8)		19	48,0	47,9	2,4 <i>dd</i>	
4	38,7	38,3	-					(16,4, 5,3)	
5	55,3	55,2	0,7		20	150,9	150,6	-	
6	18,3	18,3	1,64; 1,4		21	29,8	29,8	1,94; 1,35	
7	34,3	34,2	1,4		22	40,0	39,9	1,42; 1,22	
8	40,8	40,9	-		23	28,0	28,0	0,99	0,98
9	50,4	50,3	1,28		24	15,4	15,4	0,79	0,78
10	37,1	37,1	-		25	16,1	16,1	0,85	0,83
11	20,9	20,9	1,4; 1,28		26	16,0	15,9	1,04	1,03
12	25,1	25,1	1,68; 1,05		27	14,5	14,5	0,97	0,95
13	38,0	38,0	1,7		28	18,0	18,0	0,81	0,78
14	42,8	42,8	-		29	109,3	109,2	4,71; 4,59	4,62
15	27,4	27,4	1,58		30	19,3	19,3	1,69	1,70

Attributions réalisées à partir de l'expérience XHCORR

Schéma 22. Fragmentations de masse du composé **16** (SM-IE)

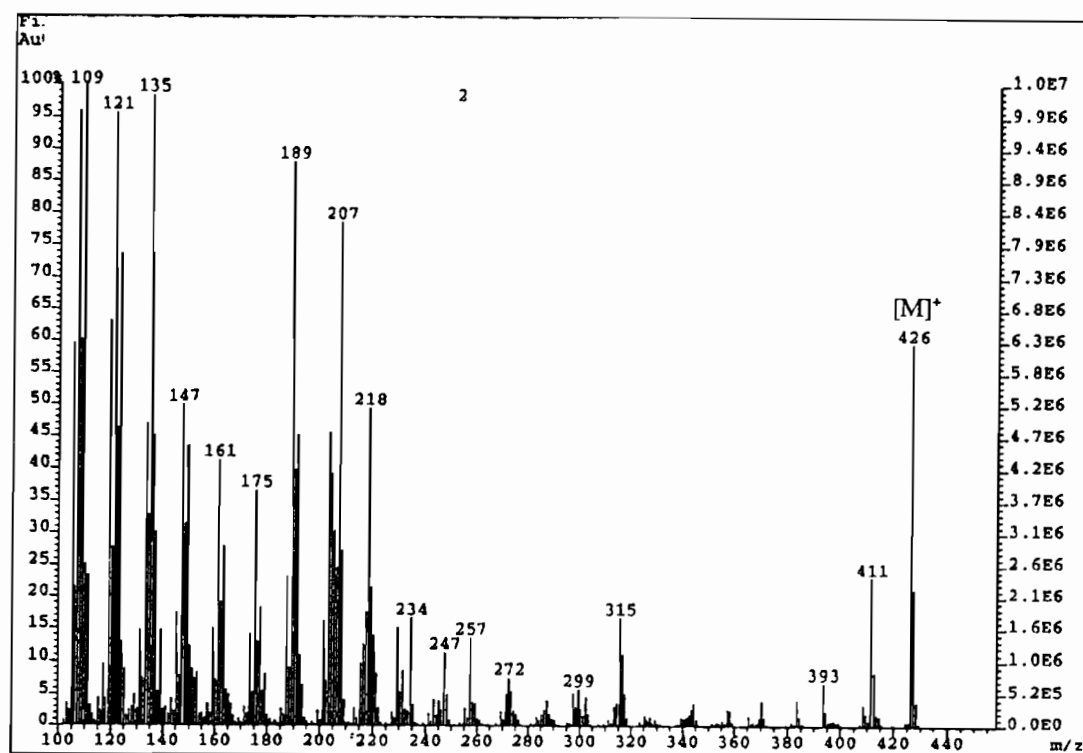
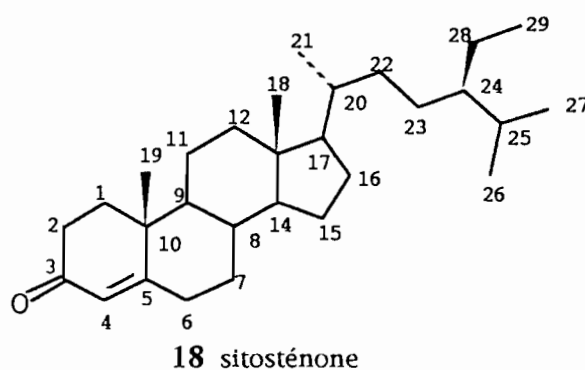
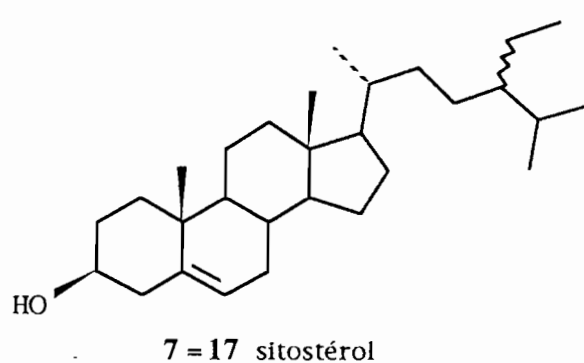


Figure 78. Spectre de masse sous impact électronique du composé 16

L'identité du composé 17 comme β -sitostérol a été établie d'après la comparaison des données de RMN ^1H avec celles de la littérature.¹³⁴ Son analyse structurale a été déjà discutée auparavant lors de la présentation des principes actifs de *Qualea paraensis* (composé 7).



Le composé 18, a été identifié comme la (24*R*)-stigmast-4-en-3-one, appelée aussi sitost-4-en-3-one ou β -sitosténone. Ses spectres de RMN et de masse ont été comparés à ceux déjà publiés dans la littérature¹³⁵ (Figure 79, Tableau 48).

Par rapport au sitostérol (17), le spectre du proton de 18 montre l'absence du proton d'alcool secondaire H-3 attendu à δ 3,55. Le doublet du proton vinylique (5,37 dans 17) se présente ici sous la forme d'un singulet déblindé de +0,42 ppm à δ 5,75 (*sl*, H-4) traduisant un proton en α de la cétone: d'où un système éthylénique conjugué à la cétone (α,β insaturée). Cette information est confirmée par l'existence du carbonyle δ 199,7 (C-3) dans le spectre de RMN ^{13}C de 18.

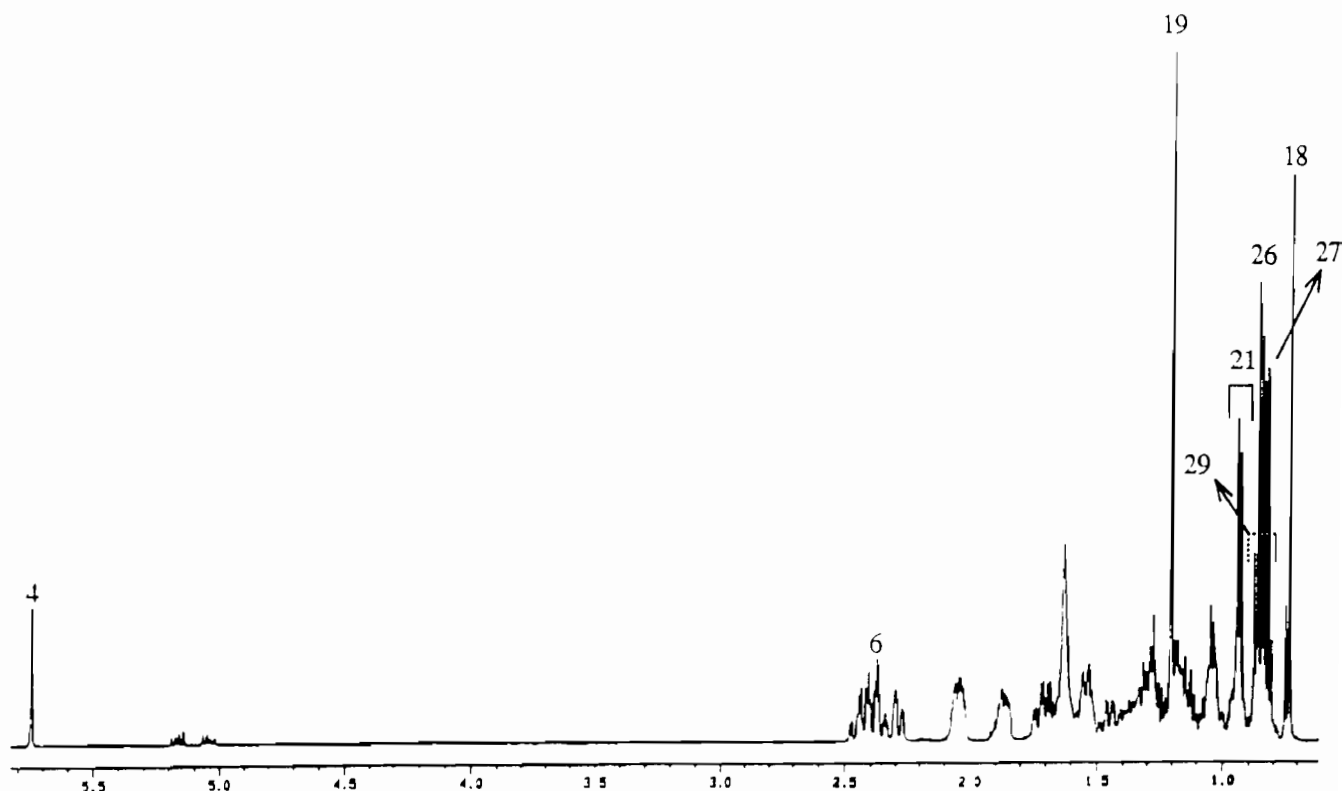


Figure 79. Spectre de RMN ^1H du composé 18 (500 MHz)

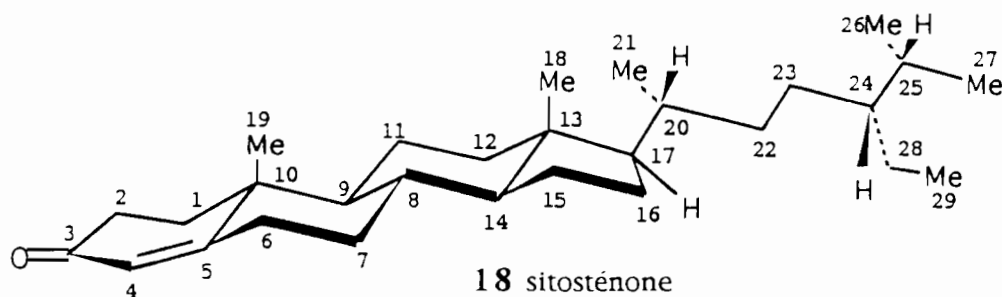
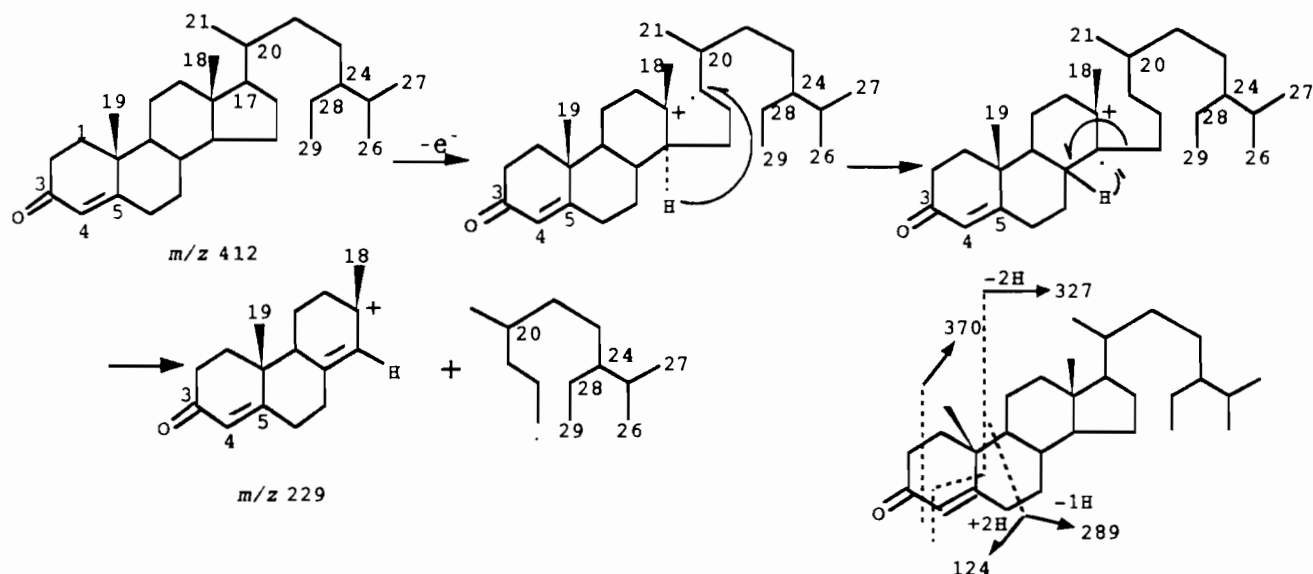


Tableau 48. Données de RMN de **18** dans CDCl_3 , à 500 MHz (^1H) et à 125,8 MHz (^{13}C) et de la sitosténone¹³⁵

Atome	18 ^{13}C	réf. 135	18 ^1H	réf. 135	Atome	18 ^{13}C	réf. 135	18 ^1H	réf. 135
1	35,6	35,7			16	28,1	28,2		
2	33,9	34,0			17	55,8	56,1		
3	199,7	198,9	-	-	18	11,9	12,0	0,74	0,71
4	123,7	123,8	5,75	5,72	19	17,3	17,4	1,21	1,18
5	171,7	171,1	-	-	20	36,1	36,2		
6	32,9	33,0			21	18,7	18,7	0,94	0,92
7	32,0	32,1			22	33,8	34,0		
8	35,6	35,1			23	26,0	26,2		
9	53,8	53,9			24	45,8	45,9		
10	38,6	38,7	-	-	25	29,1	29,3		
11	21,0	21,1			26	19,8	20,2	0,86	0,84
12	39,5	39,71			27	19,0	18,8	0,83	0,81
13	42,3	42,4	-	-	28	23,0	23,1		
14	55,9	56,0			29	11,9	12,0	0,88	0,85
15	24,1	24,2							

Le spectre de masse de la sitosténone **18** (Figure 80), présente son ion moléculaire à m/z 412 ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$) et des fragments obéissant au Schéma 23 de fragmentations, typiques des 4-en-3-cetostéroïdes¹³⁶ et des phytostérols.¹³⁷

Schéma 23. Fragmentations du composé **18** sous impact électronique

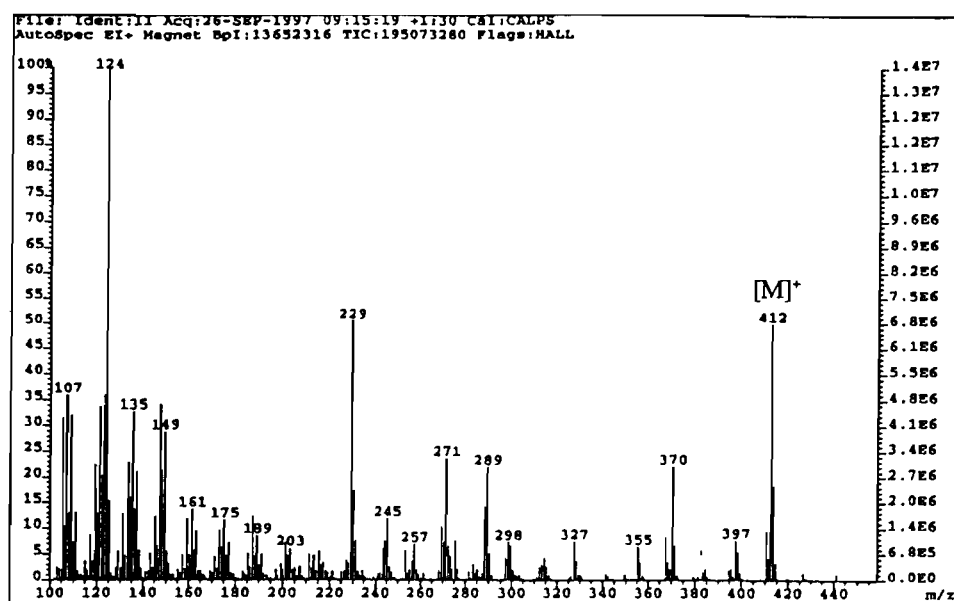
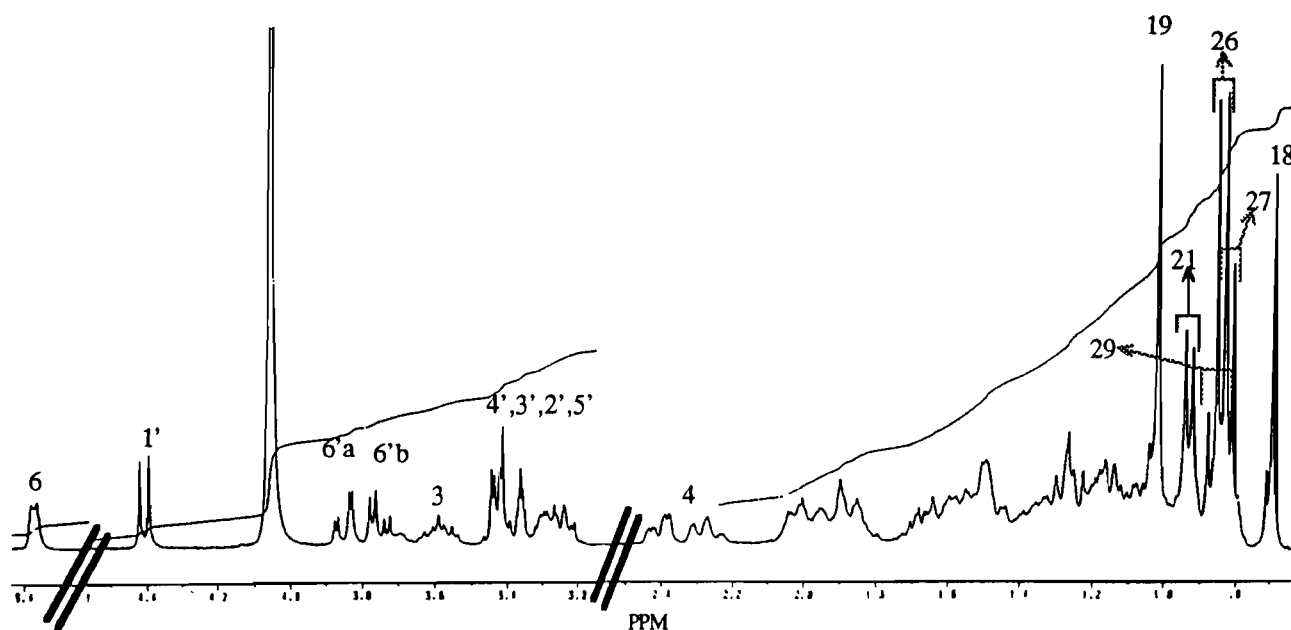


Figure 80. Spectre de masse sous impact électronique du composé 18

Le composé 19, composant majoritaire d'une des fractions rapportées très actives contre *Plasmodium falciparum*, présente une très mauvaise solubilité dans les mélanges de CHCl_3 -MeOH à différentes proportions. Son insolubilité dans le CHCl_3 pur, (contrairement aux composés 17 et 18) et sa solubilité partielle en formant un précipité dans CH_3OH indiquent une structure hétérosidique mais avec peu d'unités osidiques.

Figure 81. Spectre de RMN ^1H du composé 19 (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$)

Dans le spectre de RMN ^1H du composé **19** (Figure 81) les signaux du β -sitostérol sont retrouvés à δ 5,37 (*dl*, $J = 5,0$ Hz, H-6), 3,59 (*m*, H-3), 1,01 (3H, *s*, H-19), 0,94 (3H, *d*, $J = 7,0$ Hz, H-21), 0,85 (3H, *t*, $J = 7,0$ Hz, H-29), 0,84 (3H, *d*, $J = 7,0$ Hz, H-26), 0,82 (3H, *d*, $J = 7,0$ Hz, H-27), 0,69 (3H, *s*, H-18). Plusieurs protons en α d'hydroxyle résonnent entre 3,2 et 4,4 ppm laissant envisager la présence d'un sucre. Un doublet de proton anomérique se situe à δ 4,41 (*d*, $J = 7,9$ Hz), et la partie AB d'un système ABX à δ 3,84 (1H, *dd*, $J = 10,2$ et $5,0$ Hz) et à δ 3,74 (1H, *dd*, $J = 10,2$ et $3,7$ Hz) pour un groupement alcool primaire $\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$. L'expérience COSY permet de relier les protons osidiques à partir du proton anomère. Cette unité osidique est un hexose à 7 spins couplés. Le spectre RMN ^1H à 300 MHz de **19**, est identique à celui réalisé sur un échantillon hémisynthétique de 3-O- β -D-glucopyranosyl β -sitostérol,¹³⁸ Tableau 49.

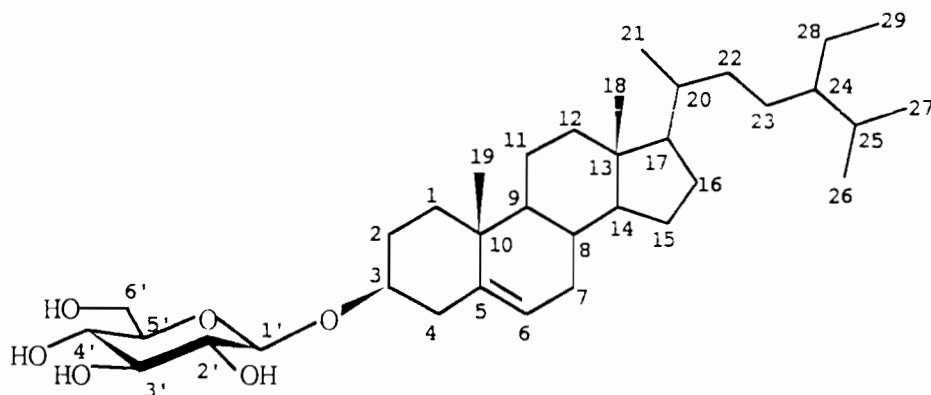
Tableau 49. Données de RMN de **19** dans $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ à 300 MHz (^1H) et à 75,0 MHz (^{13}C) et du 3-O- β -D-glucopyranosyl β -sitostérol dans CDCl_3 à 300 MHz (^1H)¹³⁸ et dans $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ à 25,2 MHz (^{13}C)¹³⁹

Atome	19 (^{13}C)	ref.139	19 (^1H) $\mathcal{J}$	ref.138	Atome	19 (^{13}C)	ref.139	19 (^1H) $\mathcal{J}$	ref.138
1	37,0	37,6	1,86; 1,08		20	35,8	36,5		
2	29,3	30,4	1,91		21	18,4	19,1	0,94 <i>d</i> (7)	
3	78,8	78,1	3,59 <i>m</i>	3,63	22	33,6	34,3		
4	39,5	40,0	2,41; 2,27	2,40; 2,30	23	25,7	26,5	1,18	
5	140,0	140,8	-	-	24	45,6	46,1	0,92	
6	121,8	121,9	5,37 <i>d</i> (5)	5,18 <i>d</i> (6)	25	28,8	29,6	1,66	
7	31,6	32,2	1,96; 1,98		26	19,4	19,3	0,84 <i>d</i> (7)	
8	31,6	32,2			27	18,6	20,1	0,82 <i>d</i> (7)	
9	49,9	50,4	0,92		28	22,8	23,5	1,27	
10	36,4	37,0	-	-	29	11,6	12,3	0,85 <i>t</i> (7)	
11	20,8	21,4	1,52; 0,84		1'	100,8	102,6	4,41 <i>d</i> (7)	4,45 <i>d</i> (7,6)
12	38,4	39,4	2,02		2'	75,6	75,3	3,29	3,25
13	42,0	42,6	-	-	3'	76,2	78,1	3,43	3,43
14	56,5	56,9			4'	69,9	71,7	3,43	3,41
15	24,0	24,6	1,58		5'	73,3	78,6	3,26	3,32
16	27,9	28,6			6'	61,5	62,9	3,84 <i>dd</i>	3,90 <i>dd</i>
17	55,8	56,3	1,23					(10,2, 5,0)	(11,5, 6,1)
18	11,5	12,1	0,69 <i>m</i>					3,74 <i>dd</i>	3,75 <i>dd</i>
19	18,9	19,5	1,01					(10,2, 3,7)	(11,5, 3,8)

$\mathcal{J}$ Attributions à partir de l'expérience HMQC

Le spectre de RMN ^{13}C (Tableau 49), montre les 29 signaux du squelette stérol et six carbones osidiques d'un hexose. Les valeurs des déplacements chimiques obtenues confirment la moitié β -

sitostérol à partir des données du β -sitostérol glucosylé¹³⁹ et de divers glycosides de β -sitostérol.^{140,141,142,143,144} et d'autre part la moitié osidique comme étant un β -D-glucose.¹³⁹



19 3-O- β -D-glucopyranosyl β -sitostérol

V.CINQUIÈME PARTIE

CONCLUSION

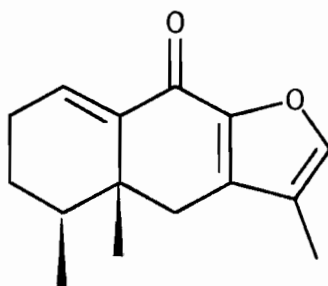
L'étude approfondie de six espèces originaires de Bolivie a été accomplie du point de vue de leur composition chimique et de leur activité biologique en particulier celle anti-parasitaire. Suite à des enquêtes ethnobotaniques chez trois ethnies boliviennes: les Chácobo, les Raqaypampeños et les Tacanas, cinq de ces espèces ont été sélectionnées à partir des résultats de criblage biologique parmi les plus intéressants. Une dernière espèce provenant des hauts plateaux de Potosí a aussi été étudiée; elle est considérée comme médicinale par les tradipraticiens Kallawayas.

L'objectif de cette recherche a été de séparer et caractériser les principes actifs de ces plantes ou au moins d'évaluer les indices d'activité, de sélectivité et toxicité des molécules isolées à partir des extraits actifs. Ces composés ne sont pas toujours les responsables des activités détectées dans les extraits. En effet certaines molécules isolées manifestent une activité inférieure à celle des extraits. Ce dernier fait expérimental survient fréquemment. L'activité n'est pas toujours due aux composants majoritairement présents dans l'extrait de départ. Elle peut être due au mélange des différents composés de structure proche (effet synergique). Les composés identifiés peuvent être aussi considérés comme des éléments potentialisateurs ou antagonistes d'un produit minoritaire de structure inconnue présent dans la plante et qui manifesterait (s'il était isolé) des indices d'activité égaux ou supérieurs à ceux des extraits bruts de départ.

Cette étude approfondie a permis d'augmenter les connaissances de chaque espèce végétale en ajoutant de nouvelles données chimiques inconnues auparavant et de confirmer l'activité ethnomédicale rapportée ou d'ajouter de nouvelles activités non décrites à ce jour.

Senecio smithioides, Cabrera (Asteraceae)

Cette espèce 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 (1) avec une CI_{50} de 1,2 $\mu\text{g/ml}$ sur des souches chloroquinosensibles de *Plasmodium falciparum*.

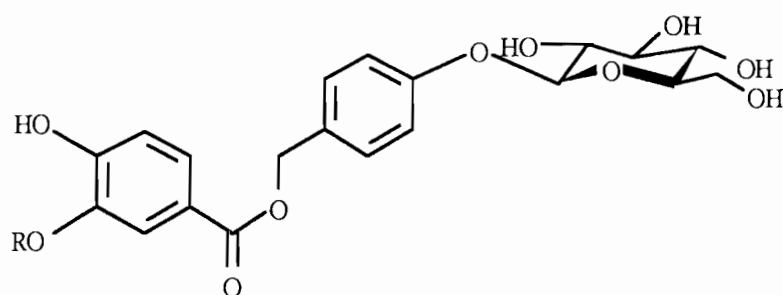


1 furanoérémophil-1(10)-en-9-one

Ce composé est le composant majoritaire de l'extrait éthéro-pétroléique, l'extrait manifestant une activité antipaludique proche à 1 $\mu\text{g/ml}$ (CI_{50}). Ce composé semble donc être responsable de l'activité antimalarique de l'espèce. Néanmoins l'étude de la cytotoxicité du composé 1 doit être réalisée afin d'évaluer un indice thérapeutique.

Amburana cearensis, A. C. Smith (Fabaceae)

La coumarine (2) majoritairement présente dans l'espèce semble d'être le principe actif sur *Plasmodium falciparum* (CI_{50} 9 $\mu\text{g/ml}$, souche chloroquinosensible) de l'extrait diclorométhane et éthéro-pétroléique. La présence de la coumarine dans des graines des espèces du genre *Amburana* a été déjà mentionnée auparavant. Les composés phénoliques l'amburoside A (3) et l'amburoside B (4) sont des composés nouveaux. Ils s'ajoutent à la petite famille de composés phénoliques glycosylés, les membres plus représentatifs se trouvant chez les Flacourtiaceae.



3 R= H, amburoside A

4 R= CH_3 , amburoside B

Seul le composé 3 manifeste une activité antipaludique semblable à celle de la coumarine (CI_{50} 9,1 $\mu\text{g/ml}$, souche chloroquinosensible) et ses indices d'activité dépassent ceux de l'extrait d'origine. Le composé 3 peut être donc considéré comme le responsable de l'activité antiplasmodiale de cet extrait.

L'activité antibactérienne de la coumarine 2 est intéressante (inhibition de la croissance de *Escherichia coli* et *Shigella flexneri* à 0,125 mg/ml). Etant donné la faible cytotoxicité de ce produit, il pourrait éventuellement être testé comme antibactérien chez l'animal dans un modèle approprié.

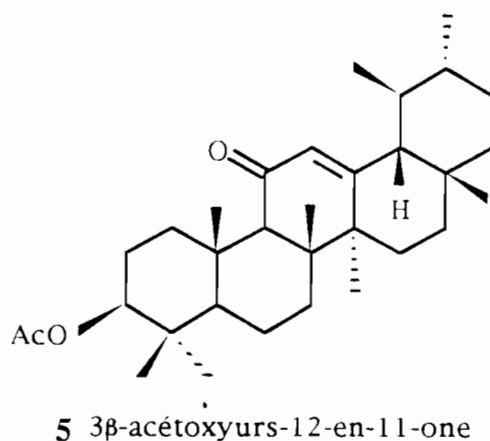
Les indices d'activité obtenus sont en accord avec les données ethnopharmacologiques recueillies auprès des Chácobo. Cette étude constitue la première discussion sur les activités antimalarique, antileishmanienne et contre la maladie de Chagas pour la coumarine (2).

Qualea paraensis, Ducke (Vochysiaceae)

Parmi les deux extraits les plus actifs contre *Plasmodium falciparum*, celui obtenu à l'éther de pétrole et celui au méthanol, seul le premier a été étudié et purifié.

La complexité des fractions n'a permis l'isolement que de trois produits purs minoritaires et un mélange non résolu de trois composés dont l'activité antipaludique est la plus proche de celle de l'extrait brut (CI_{50} 4,2 μ g/ml, souche chloroquinosensible).

Les produits purs manifestent une activité antiplasmodiale moyenne pour les composés **5** (3- β -acétoxyurs-12-en-11-one, CI_{50} 9 μ g/ml) et **7** (sitostérol, 6,0 μ g/ml) et nulle pour le composé **6** (acétate de glut-5-en-3 β -yl). 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.



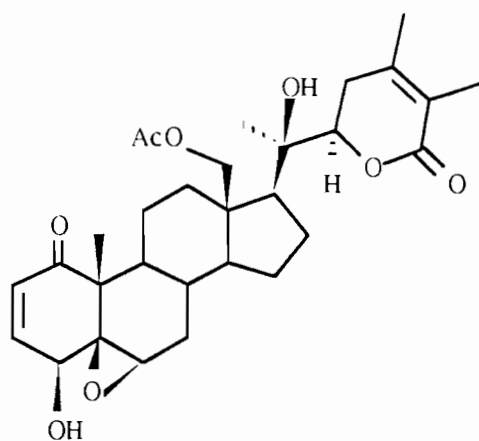
La 3- β -acétoxyurs-12-en-11-one (**5**) est pour la première fois isolée comme un produit naturel. Ce composé est décrit dans la littérature comme le dérivé acétylé hémisynthétique de la 3- β -hydroxyurs-12-en-11-one isolée des espèces *Canarium zeylanicum* et *Ilex goshiensis*.

Dunalia brachyacantha, Miers (Solanaceae)

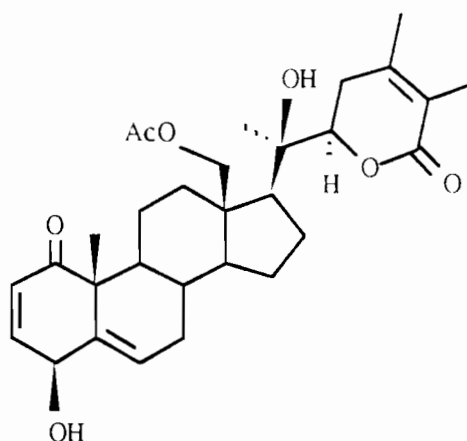
Le genre *Dunalia* (*Acnistus*) est connu pour renfermer des withanolides; l'identification des deux withanolides **8** (18-acétoxywithanolide D) et **9** (18-acétoxy-5,6-déoxy-5,6-dédihydro-withanolide D) à partir des feuilles et des deux withanolides glycosylés **10** et **11** (dunawithanines G et H) dans les racines, le confirment. Le travail de séparation et l'étude bioguidée des fractions appliqués à l'exemplaire récolté à La Paz, a permis l'obtention de deux withanolides **8** et **9** présentant une bonne activité contre les leishmanioses et la maladie de Chagas. La lyse totale des parasites est obtenue à des concentrations de 25 et 10 µg/ml et la disparition de 50% de formes épimastigotes et promastigotes de *Leishmania braziliensis* à la dose de 1 µg/ml. Une activité bactéricide remarquable pour **8** et **9** 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**. Les 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** sont largement responsables de l'activité de l'extrait de départ.

L'activité antibactérienne rapportée par les Raqaypampeños pour les feuilles de *D. brachyacantha* est corroborée par notre étude.

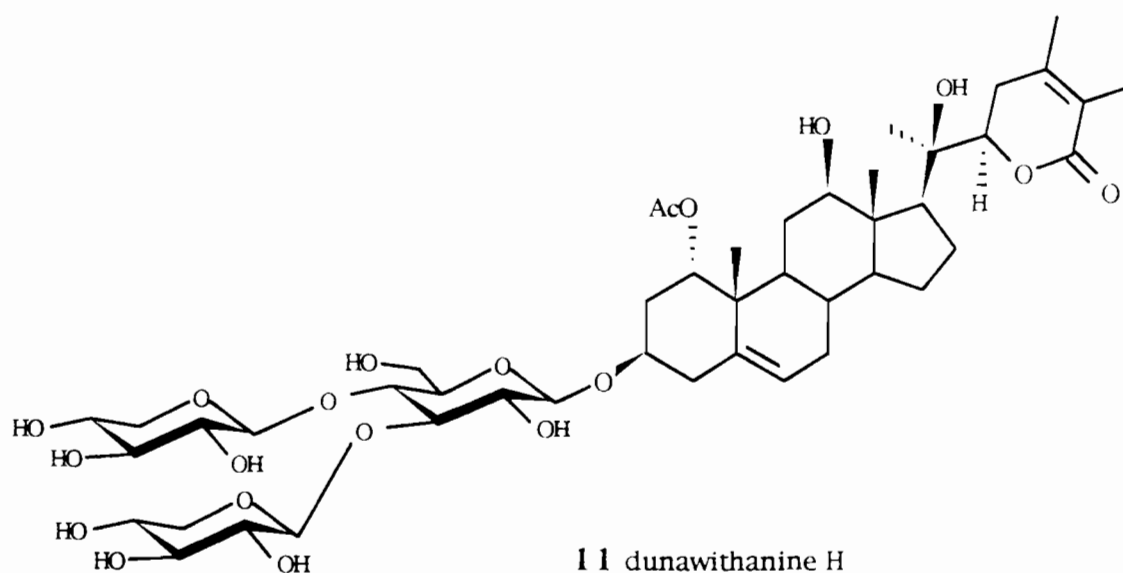
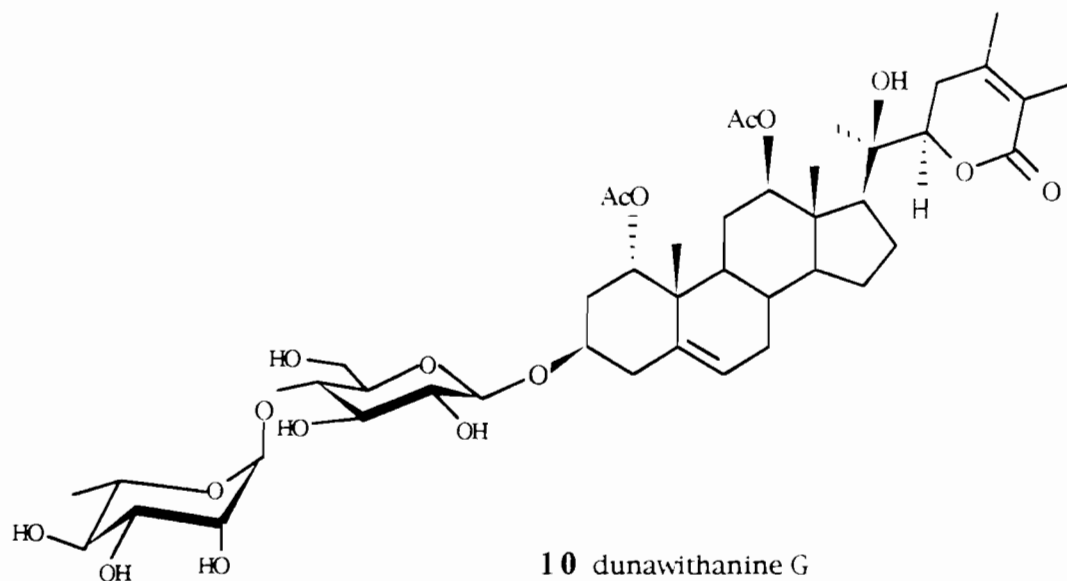


8 18-acétoxywithanolide D



9 18-acétoxy-5,6-déoxy-5,6-dédihydro-withanolide D

Le withanolide glycosylé **10** malgré son manque d'activité biologique présente un intérêt structural, et contribue avec le composé **11** à enrichir la famille des withanolides glycosylés décrits jusqu'à maintenant.



La dunawithanine G (**10**) est un composé nouveau qui présente comme caractéristiques structurales une nouvelle génine et le rhamnose présent pour la première fois dans la famille des withanolides glycosylés. Le composé **11** appelé dunawithanine H, est aussi un composé nouveau qui doit sa

nouveauté à une combinaison de la chaîne osidique de la dunawithanine C et la génine rapportée pour la dunawithanine F de *Dunalia australis*.

Notholaena nivea var. *flava*, Hook (Pteridaceae)

La récolte de cette espèce chez les Raqaypampeños a été réalisée suite aux renseignements ethnobotaniques laissant supposer une activité antibactérienne pour cette plante. A partir des résultats des criblages primaires antibactériens et antifongiques des extraits, il a été recherché des principes actifs antifongiques.

Les bons indices d'activité de l'extrait obtenu par le dichlorométhane contre des champignons filamenteux et la levure ont conduit à la purification de quatre flavonoïdes dont deux sont actifs.

Les flavanones **12** ou pinocembrine, et **14** ou sakuranetine 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 µg/ml par rapport au ketoconazole. L'activité des composés purs par rapport à l'extrait de départ est très insuffisante, ce qui impliquerait la recherche d'un autre agent antimycosique auquel l'activité initiale de l'extrait serait imputable. Deux autres composés connus ont été isolés et entièrement caractérisés: la pinostrobin (13) et la 2',6'-dihydro-4'-méthoxy-dihydrochalcone (15).

Ce travail constitue une première approche à l'étude chimique bioguidée de l'espèce *Notholaena nivea* var. *flava*., aussi bien que celle relative à l'activité antifongique de la pinocembrine et la sakuranetine.

Cavanillesia aff. *hylogeiton*, Ulbr. (Bombacaceae)

L'activité antipaludique manifestée par l'extrait CH₂Cl₂ avec 100% d'inhibition de la parasitémie sur des souches chloroquino-sensible et -résistante, a été retrouvée sur des fractions lors de la première séparation. De ces fractions a été identifié le lupeol (**16**), le composé 3-O-giucosylsitostérol (**19**), le sitostérol (**17**) et la sitosténone (**18**). Tous ces composés se sont révélés être ceux inactifs. La répétition des essais biologiques sur les premières fractions actives a montré une perte totale de l'activité. Ces résultats contradictoires suggèrent une perte de l'activité dans le procédé de séparation

ou la possibilité d'avoir des effets de toxicité dus à des contaminations par de traces de solvants plutôt que des effets relatifs à une activité antipaludique propre.

La caractérisation des composés isolés ne présente pas de valeur du point de vue structural, mais elle permet une première analyse de la composition chimique de cette plante en égard à l'inexistence des données chimiques sur cette espèce et sur ce genre.

Perspectives

Les composés **8** et **9** 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. Etant donné la nouveauté structurale de la génine de la dunawithanine G (**10**) et l'inexistence de données sur les activités biologiques de la génine de la dunawithanine H (**11**), une hydrolyse des withanolides pour séparer les génines correspondantes est fortement recommandée. Cette séparation donnerait la possibilité d'évaluer les indices d'activité antiparasitaire, antibactérienne et antifongique de ces génines.

Retravailler l'espèce *N. nivea* var. *flava* pour rechercher le principe actif responsable de l'activité antifongique serait intéressant étant donné les très bons indices d'activité initiaux des extraits de départ comparés à la drogue de référence, le ketoconazole.

En raison de leurs activité antiparasitaire, de leur abondance et leur accès facile, ces deux espèces sont de bons candidats pour des études complémentaires en vue du développement d'un phytomédicament, dans le cadre de projets de développement durable au niveau communautaire.

Ce genre de projets est soutenu par le gouvernement Bolivien et s'adressent 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 de la Santé Bolivien.

Notre travail, basé sur des critères scientifiques reconnus, représente donc un premier pas fondamental qui va dans le sens d'une démarche essentielle pour, non seulement, aider le système de soins de santé primaire du pays mais aussi pour aider la microentreprise dans le cadre du développement durable.

VI.SIXIÈME PARTIE

DONNÉES EXPÉRIMENTALES

VI.1.Généralités

VI.1.1.Appareillage

Les spectres de RMN et les expériences bidimensionnelles ont été réalisés à l'aide des microprogrammes BRUKER sur trois spectromètres BRUKER: AC 250, AC 300 (modifié de façon à pouvoir détecter le proton en mode inverse et disposant de la cohérence de phase entre le découpleur et le récepteur en detection proton) et DRX 500.

Les spectres UV sont enregistrés sur un appareil HITACHI PERKIN-ELMER 200 et PV 8720 UV/Vis, PHILIPS.

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un appareil MICROGRAPH JOBIN YVON.

Les spectres IR sont enregistrés sur un appareil BECKMAN AccuLab 4 assisté par un ordinateur.

Les pouvoirs rotatoires sont mesurés au moyen d'un polarimètre électronique PERKIN ELMER 241.

Les points de fusion sont mesurés au microscope à platine chauffante REICHERT et ne sont pas corrigés.

Les spectres de masse sous impact électronique et en FAB mode positif sont réalisés sur un appareil VG-AUTOSPEC. Pour les spectres en FAB, la solution méthanolique ou chloroformique est additionnée à la matrice m-NBA (alcool m-nitrobenzylique) ou m-NBA+LiCl.

Les spectres de masse LSIMS sont enregistrés sur un spectromètre ZABSPEC-T en tandem à cinq secteurs. Les expériences LSIMS sont réalisées avec un bombardement d'ions de Li^+ (30 keV). Les spectres de masse Tandem MS/MS sont enregistrés sous CID, 4keV avec des ions Na^+ .

VI.1.2.Supports chromatographiques

La silice utilisée pour les systèmes chromatographiques en colonne à moyenne pression (CCMP) et sous vide (VLC), est commercialisée par MERCK sous la référence 60 H (5-40 μm). La silice pour les systèmes chromatographiques en colonne à pression atmosphérique (CC) est étiquetée comme MERCK kieselgel 60, 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM).

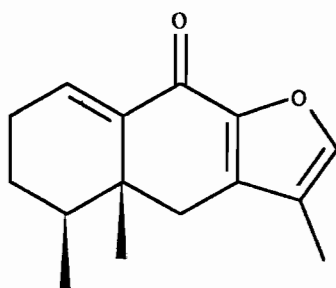
La chromatographie de filtration par exclusion moléculaire est réalisée sur SÉPHADEX® LH-20.

Les chromatographies sur couche mince et sur plaques préparatives (CPP) ont été réalisées sur des plaques de silice sur support de verre de marque WHATMAN (250 et 500 µm, PK 6F, gel 60A).

VI.2.Extraction et purification des composés

VI.2.1.Extraction et purification du composé 1 de *Senecio smithioides*

Des feuilles de *S. smithioides*, furent récoltées en octobre 1996, dans la localité San Juan, au croisement de la route Potosí-Uyuni avec le fleuve San Juan, à 65 km de la ville de Potosí, à une altitude de 3850 mètres au-dessus du niveau de la mer. L'espèce a été identifiée par la Lic. E. Garcia, un spécimen original est déposé à l'Herbier National de Bolivie à l'Université San Andrés de La Paz.



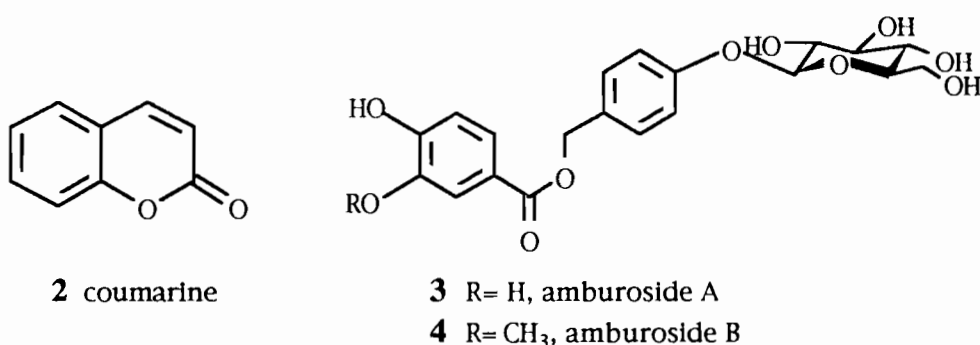
1 furanoérémophil-1(10)-en-9-one

77,9 g de feuilles sèches de *S. smithioides* sont broyées et mises à macérer dans l'éther de pétrole (fr. 40-60°, 0,5 l) pendant 24 h. L'extrait pétroléique (1,34 g, 1,72%), est concentré à pression réduite pour rendre un précipité cristallin blanc, composé 1 (1,0 g, 1,3%). Après filtration des cristaux, le filtrat pese 0,34 g. Ce composé, a été recristallisé dans l'éther de pétrole (fr. 20 - 40°).

VI.2.2.Extraction et purification des composés 2, 3 et 4 de *Amburana cearensis*

Le matériel végétal d'*Amburana cearensis* a été récolté et identifié par le Dr. Sylvie Bergeron pendant les travaux ethnobotaniques dans la région Alto Ivon du département du Beni (Bolivie) au mois de

novembre 1993. Un spécimen est déposé sous le code SB-467 à l'Herbier National de Bolivie, à l'Université San Andrés de La Paz.



Les écorces de tronc pulvérisées (1 kg) ont été extraites successivement au Soxhlet avec de l'éther de pétrole (fr. 40-60°, 5 l), du CH₂Cl₂ (1,5 l) et de l'AcOEt (1,5 l). L'extrait CH₂Cl₂ (4,3 g) a été purifié par chromatographie sur silice 60 H (300 g) en CCMP, en utilisant comme éluant des mélanges de CH₂Cl₂/MeOH de pouvoir d'élution croissant. La coumarine pure, **2** (1,44 g, 0,14%) a été obtenue dans les fractions 20-36 éluées par le CH₂Cl₂ pur. L'extrait AcOEt (1 g) a été soumis à un système VLC sur gel de silice 60 H (283 g) en utilisant des mélanges CH₂Cl₂-MeOH comme éluant (Tableau 50).

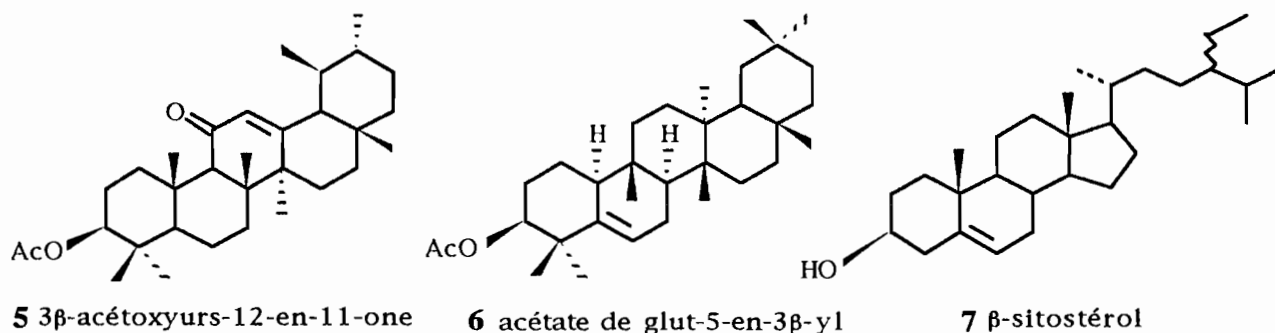
Tableau 50. Chromatographie VLC de l'extrait à l'acétate d'éthyle (1 g)

Fraction	Eluant CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Poids (mg)	Composé renfermé
1	100:0	0	
2	100:0	8	
3	99:1	4	
4	99:1	2	
5	98:2	3	
6	98:2	1	
7	97:3	6	
8	97:3	1	
9	96:4	3	
10	95:5	1	
11	95:5	3	
12	90:10	2	
13	90:10	13	
14	85:15	10	
15	85:15	91	4
16	80:20	275	4, 3
17	80:20	245	3
18	0:100	322	

La fraction 15 (91 mg) a été purifiée dans une CCM préparative et développée avec CH_2Cl_2 -MeOH (4:1) pour isoler l'amburoside B 4 (0,015 g, 0,0015%, R_f 0,62). La fraction 17 renferme le composé 3 (0,23 g, 0,023%, R_f 0,47) ou amburoside A.

VI.2.3.Extraction et purification des composés 5, 6 et 7 de *Qualea paraensis*

Les écorces de tronc de *Q. paraensis* ont été récoltées par le Dr. Sylvie Bergeron en prenant quatre échantillons d'herbier qui sont déposés à l'Herbier National de Bolivie à l'Université San Andrés de La Paz sous le code SB-164.



980 g d'écorces de tronc pulvérisées ont été mises à macérer dans EtOH 95°-H₂O (70:30) pendant huit semaines en soutirant la phase liquide chaque semaine qui est ainsi renouvelée. Par extraction liquide-liquide, l'extrait EtOH (50 g) fut partagé entre le CH_2Cl_2 (14 g) et l'eau (36 g). Une partie de l'extrait CH_2Cl_2 (6,1 g) a été partagée entre le MeOH (2,9 g) et l'éther de pétrole (3,2 g).

Sur 2 g de l'extrait MeOH obtenu, une CC de Séphadex LH-20 élue au MeOH permet d'obtenir 9 fractions. Les fractions 2+3 (0,9 g) ont été séparées dans un système VLC sur silice 60 H avec des mélanges CH_2Cl_2 /MeOH pour donner 15 fractions.

1,5 g de l'extrait à l'éther de pétrole, ont été séparés en CC sur silice 60 (60 g) par les systèmes d'élution, EP/ CH_2Cl_2 et CH_2Cl_2 /MeOH pour obtenir 32 fractions regroupées en 12 regroupements (Tableau 51).

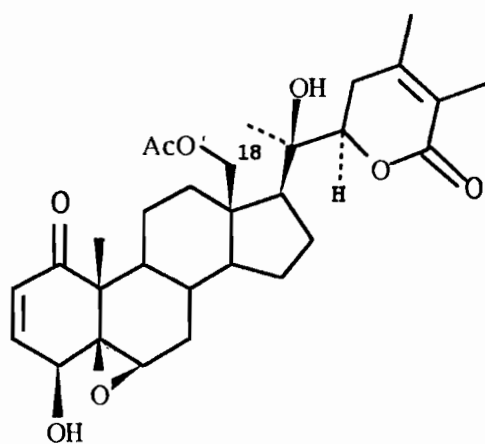
Tableau 51. Chromatographie en colonne ouverte de l'extrait à l'éther de pétrole (1,5 g)

Fraction	Eluant EP-CH ₂ Cl ₂	Volume (ml)	Poids (mg)	Composé renfermé
1	30:70	100	11,4	
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH			
2	100:0	100	210	6
3	100:0	100	17,4	
4	100:0	100	5,6	
5	99,5:0,5	100	13,2	
6-10	99,5:0,5;99:1	500	196,6	
11	99:1	100	10,4	
12-17	98,5:1,5;98:2;97,5:2,5	600	94	5, 7
18-20	97:3	300	499	
21-23	93:7	300	124,6	
24-27	75:15	400	61,6	
28-32	75:15,0:100	500	82,3	

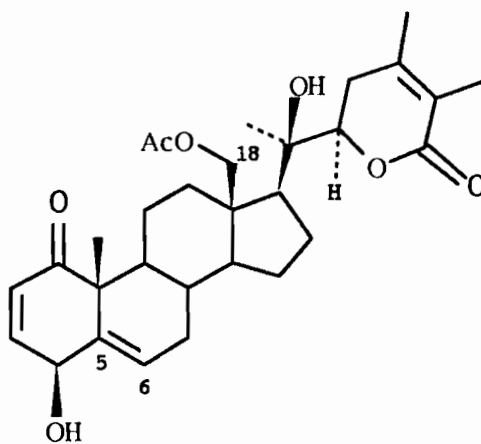
La fraction 2 (0,21 g, 0,021%), a été soumise à une CCM préparative et élue dans CH₂Cl₂-Hex (17:3) pour obtenir le composé 6 (0,00837 g, 0,0009%, R_f 0,46). La fraction 8 (0,094 g, 0,0096%), a été soumise à une CCM préparative et élue dans CH₂Cl₂-MeOH (99:1) pour fournir le composé 7 (0,021 g, 0,0021%, R_f 0,20) et le composé 5 (0,019 g, 0,0019%, R_f 0,60).

VI.2.4.Extraction et purification des composés 8, 9, 10 et 11 de *Dunalia brachyacantha*

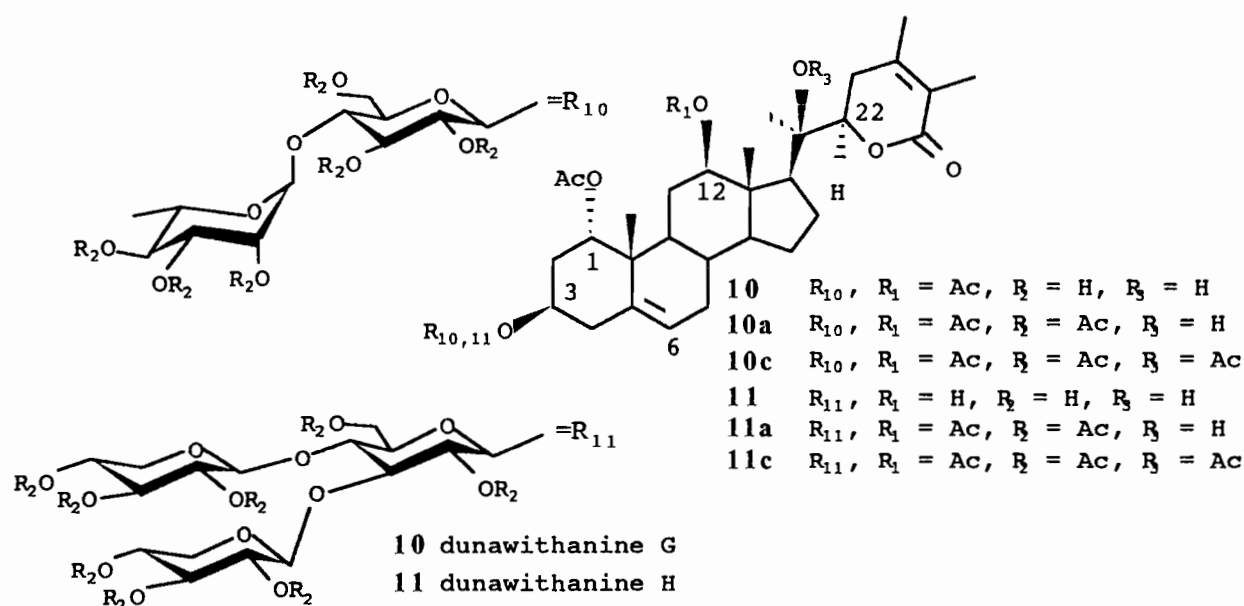
La plante entière *Dunalia brachyacantha* Miers. in Hooks, a été récoltée dans la vallée de Cota-Cota (3300 mètres) à La Paz, au mois d'août 1996. La plante a été authentifiée par le Dr. G. Bourdy; un échantillon sous le code GB 1770 est déposé à l'Herbier National de Bolivie à l'Université San Andrés de La Paz.



8 18-acétoxywithanolide D



9 18-acétoxy-5,6-déoxy-5,6-dédihydro-withanolide D



Feuilles:

Les feuilles sèches et broyées (114 g) ont été extraites par percolation avec de l'EtOH-H₂O (70:30) durant 21 jours, en soutirant la phase liquide tous les 3 jours et qui est ainsi renouvelée (1,5 l). Chaque solution hydroalcoolique collectée fut évaporée et les résidus ont été rassemblés. L'extrait éthanolique final est dissous dans l'H₂O et partagé contre le CH₂Cl₂ (0,5 l). L'extrait CH₂Cl₂ est partagé contre un mélange MeOH-H₂O (90:10) et d'éther de pétrole (450 ml chacun).

L'extrait hydroalcoolique (4,78 g) a été chromatographié sur Séphadex LH-20 et élué avec du MeOH (975 ml) en donnant 13 frs (Tableau 52). Parmi elles, la fr 3 (1913 mg) a été chromatographiée sur un système VLC à silice 60 H en 14 frs éluées avec des mélanges de CH₂Cl₂-MeOH (Tableau 53). Le composé **10** représente 1017,9 mg, soit 0,89 % des feuilles sèches.

Tableau 52. *Chromatographie Séphadex LH-20 de l'extrait hydroalcoolique (4,78 g)*

Fraction	Poids (mg)
1	17
2	655
3	1943,7
4	949,1
5	129,3
6	126,4
7	108,5
8	122,1
9	67,3
10	22,9
11	10,1
12	3,9
13	2,7

Tableau 53. *Chromatographie VLC de la fraction 3 issue du Séphadex (1,9 g)*

Fraction	Eluant CH ₂ Cl ₂ -MeOH	Volume (ml)	Poids (mg)	Composé renfermé
1	100:0	230	0	
2	99:1	300	0,1	
3	98:2	300	41,2	
4	97:3	150	55,5	
5	97:3	150	33,3	
6	96:4	150	12,3	
7	96:4	150	7,4	
8	95:5	150	11	
9	95:5	150	9,8	
10	90:10	150	15,4	
11	90:10	150	138,7	
12	80:20	150	596,3	10
13	80:20	150	421,7	10
14	0:100	150	483,6	

Les frs 4 et 5 issues de la colonne de Séphadex ont été rassemblées (1,07 g) et ont été purifiées par CC sur gel de silice 60 (43 g) pour fournir 48 frs éluées avec des mélanges de CHCl₃-MeOH (Tableau 54).

Tableau 54. *Chromatographie en colonne ouverte des fractions 4 et 5 issues du Séphadex (1,07 g)*

Fraction	Eluant CHCl ₃ -MeOH	Volume (ml)	Poids (mg)	Composé renfermé
1-3	100:0	258	5,2	
4-5	99:1, 98:2	172	9,1	
6	98:2	86	5,4	
7	98:2	86	56,7	
8	97:3	86	101,4	8 et 9
9	97:3	86	42,3	8 et 9
10	97:3	86	23,1	8 et 9
11	96:4	86	12,7	8 et 9
12-13	96:4	172	74,7	
14-17	96:4,94:6	344	25,4	
18-23	94:6,92:8,88:12	516	63,5	
24-27	88:12,85:15	344	43,5	
28-29	85:15	172	51,7	
30	80:20	86	53,8	
31-33	80:20	258	78,6	
34-35	75:25	172	15,4	
36-43	75:25	240	41,5	
44-45	75:25	145	164,2	
46	0:100	220	37,4	
47	0:100	150	25,3	
48	0:100	120	5	

De la fr 9; 42,3 mg ont été purifiés par CPP sur silice normale (500 μ m) et élués avec EtOAc-Hex (90:10) pour fournir le composé **8** (R_f 0,36) et le composé **9** (R_f 0,51). De la fr 10; 23,1 mg ont été purifiés par CPP (250 μ m)X2 dans EtOAc-Hex 70:30, pour fournir de nouveau **8** (poids total 3,9 mg, 0,0034%) et **9** (poids total 15 mg, 0,013%).

Racines:

Les racines sèches et pulvérisées (1409 g), ont été mises à macérer pendant 7 jours dans 3 l de EtOH-H₂O (70:30). La solution hydroéthanolique est concentrée et la phase aqueuse résiduelle est lyophilisée. Le résidu de l'extrait hydroalcoolique (2 g) est séparé en 175 frs par CC de gel de silice 60 (80 g) et éluées avec de mélanges de CHCl₃-MeOH-H₂O (Tableau 55).

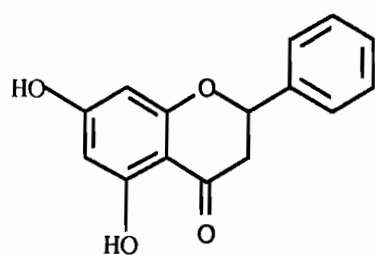
Les frs 54-61 [CHCl₃-MeOH-H₂O (80:20:0)] renferment le composé **11** (208 mg, 0,015% de racines sèches).

Tableau 55. Chromatographie en colonne ouverte de l'extrait hydroalcoolique des racines (2 g)

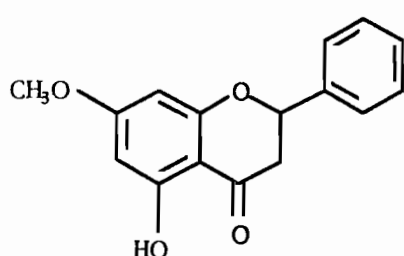
Fraction	Eluant CH ₂ Cl ₂ -MeOH-H ₂ O	Volume (ml)	Poids (mg)	Composé renfermé
2	100:0:0	100	0	11
3-4	100:0:0	200	0	
5-10	100:0:0	600	6,9	
11-18	100:0:0	800	2,4	
19-29	100:0:0	1100	4,8	
30-47	100:0,99:1:0	1800	21,9	
48-51	80:20:0	400	69,3	
52-53	80:20:0	200	27	
54-61	80:20:0	800	208,6	
62-64	80:20:0	300	46,7	
65-66	80:20:0	200	30,1	
67-68	80:20:0	200	25,0	
69-72	80:20:0,70:30:0	400	474,4	
73-74	70:30:0	200	177,5	
75-76	70:30:0	200	46,5	
77-80	70:30:0	200	118,5	
81-84	70:30:0	400	98,0	
85-97	70:30:0	1300	173,6	
98-118	70:30:0	2100	185,9	
119-135	70:30:0	1600	140,2	
136-152	70:30:0	1600	126,6	
153-168	70:30:0,70:30:2	1500	60	
169-175	70:30:2,60:40:7	600	22	

VI.2.5.Extraction et purification des composés 12, 13, 14 et 15 de *Notholaena nivea* var. *flava*

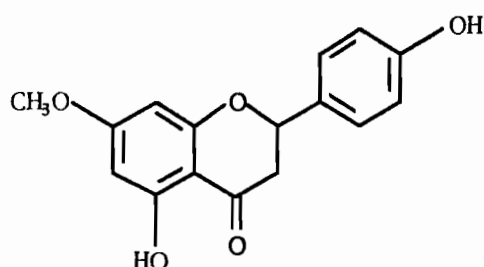
La plante entière a été récoltée pendant des enquêtes ethnobotaniques dans la vallée de Mizque dans le département de Cochabamba (3000 mètres). La plante authentifiée par la Lic. S. Arrazola, a été déposée à l'Herbier National de Bolivie à l'Université San Andrés de La Paz.



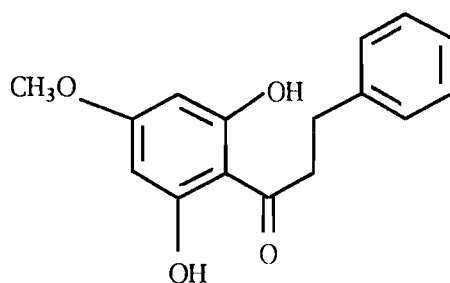
12
pinocembrine



13
pinostrobin



14
sakuranetin

**15**

2,6-dihydroxy-4-méthoxy-dihydrochalcone

Après macération des feuilles sèches et broyées (5,7 g) dans EtOH 95°-H₂O (70:30, 250ml) pendant 24 h., l'extrait a été évaporé pour enlever l'alcool et partagé contre le CH₂Cl₂ (200 ml). Le résidu organique a été séché par le Na₂SO₄ et concentré à sec, pour rendre 323,8 mg d'extrait CH₂Cl₂. La totalité de l'extrait CH₂Cl₂ a été séparé par chromatographie d'exclusion sur Séphadex LH-20, pour donner 10 fractions (Tableau 56).

Tableau 56. *Chromatographie Séphadex LH-20 de l'extrait au dichlorométhane (323,8 mg)*

Fraction	Poids (mg)
1	2,75
2	27,9
3	43,2
4	4,3
5	4,9
6	0,6
7	9
8	115,4
9	82,4
10	24,4

115 mg de la fraction 8 issue du Séphadex ont été déposés dans une CPP sur silice normale éluée par CH₂Cl₂-MeOH (95:5) et séparée en 11 fractions (Tableau 57). La fraction 6 correspond au composé 12 (0,0056 g, 0,1% de feuilles, *R_f* 0,30), et la fraction 7 au composé 15 (0,0371 g, 0,65% de

feuilles, R_f 0,38). La fraction 9 (82,4 mg) issue du Séphadex a été séparée par CPP (250 μ m)X4, éluée par CH_2Cl_2 -MeOH (98,5:1,5) en 6 bandes, la bande 5 est le composé **13** (0,0405 g, 0,7% de feuilles, R_f 0,45), et la bande 6 le composé **14** (0,0143 g, 0,25% de feuilles, R_f 0,32), voir Tableau 58.

Tableau 57. *Chromatographie sur plaque préparative de la fraction 8 (115 mg) issue du Séphadex*

Fraction 8*	Poids (mg)
bande 1 (Rf 0)	5,1
bande 2 (Rf 0,04)	2,1
bande 3 (Rf 0,16)	3
bande 4 (Rf 0,19)	6,6
bande 5 (Rf 0,25)	2,7
bande 6 (Rf 0,30) =composé 12	5,6
bande 7 (Rf 0,38) =composé 15	37,1
bande 8 (Rf 0,46)	14,5
bande 9 (Rf 0,60)	1,2
bande 10 (Rf 0,67)	2,4
bande 11 (Rf 0,79)	37,5

* éluée par CHCl_3 -MeOH (95:5)

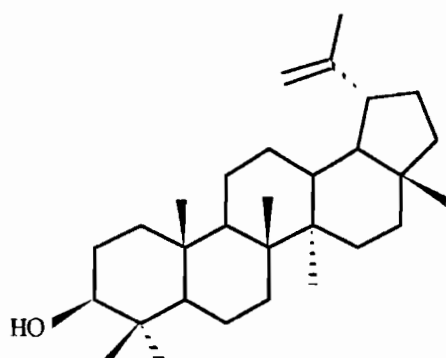
Tableau 58. *Chromatographie sur plaque préparative de la fraction 9 (82,4 mg) issue du Séphadex*

Fraction 9*	Poids (mg)
bande 1 (Rf 0,05)	14,8
bande 2 (Rf 0,14)	7,3
bande 3 (Rf 0,26)	23,2
bande 4 (Rf 0,32) =composé 14	14,3
bande 5 (Rf 0,45) =composé 13	40,5
bande 6 (Rf 0,88)	19,2

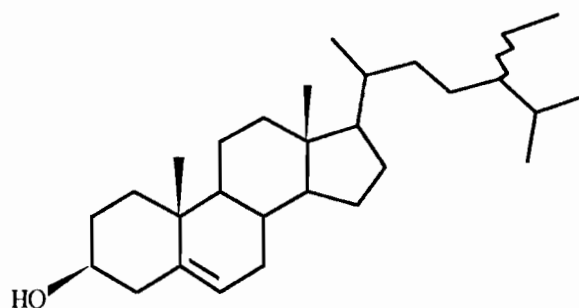
* éluée par CHCl_3 -MeOH (98,5:1,5)

VI.2.6.Extraction et purification des composés **16**, **17**, **18** et **19** (*Cavanillesia aff. hylogeiton*)

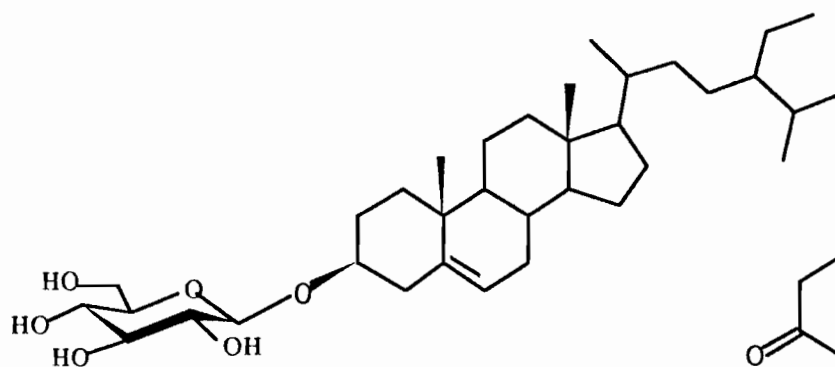
Les écorces de tronc de *Cavanillesia aff. hylogeiton* ont été récoltées pendant les enquêtes ethnobotaniques dans la région nord du département de La Paz, province Apolo (600 metres). La plante a été identifiée par le Dr. G. Bourdy, un specimen est déposé à l'Herbier National de Bolivie à l'Université San Andrés de La Paz sous le code SN O4.



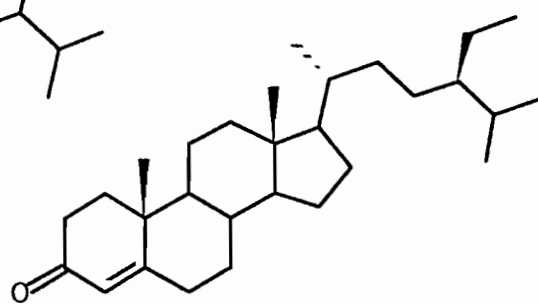
16 lupéol



17 sitostérol



18 3-O-β-D-glucopyranosyl β-sitostérol



19 sitosténone

352 g d'écorces de tronc ont été pulvérisées et extraites par macération dans l'éthanol/eau (70:30) pendant 18 jours en renouvelant le solvant (1,2 l) tous les trois jours. L'extrait hydroalcoolique (10 g, 2,8% des écorces après évaporation pour enlever l'alcool est partagé contre le CH₂Cl₂ (6 g, 1,7).

Une partie de l'extrait CH_2Cl_2 (3 g) est chromatographiée dans une colonne de VLC, sur silice 60 H et éluée par des mélanges CH_2Cl_2 -MeOH (Tableau 59).

Tableau 59. *Chromatographie VLC de l'extrait au dichlorométhane (3 g)*

Fraction	Eluant CH_2Cl_2 -MeOH	Volume (ml)	Poids (mg)	Purification Ultérieure	Composé renfermé
1	100:0	250	171,2		16
2	100:0	250	39,0		
3	100:0	250	108,8		
4	99:1	250	105,2		
5	99:1	250	70,8		
6	99:1	250	27,7		
7	98:2	250	125,1	CC 7-9	
8	98:2	250	290,1	CC 7-9	
9	97:3	250	177,0	CC 7-9	
10	97:3	250	118,9	CC 10-11	
11	97:3	250	110,7	CC 10-11	
12	96:4	250	60,4		
13	96:4	250	52,3		
14	96:4	250	57,0	CC 14-22	
15	96:4	250	22,1	CC 14-22	
16	96:4	250	26,3	CC 14-22	
17	96:4	250	11,2	CC 14-22	
18	95:5	250	8,0	CC 14-22	
19	95:5	250	13,9	CC 14-22	
20	95:5	250	12,8	CC 14-22	
21	90:10	250	15,9	CC 14-22	
22	80:20	250	46,4	CC 14-22	
23	0:100	250	133,9		
24	0:100	250	113,5		
25	0:100	250	21,4		

La fraction 3 de la VLC: renferme le composé **16**, lupéol (CH_2Cl_2 - MeOH, 100:0, 0,1088 g, 0,03%).

Les fractions 14-22 de la VLC: 213 mg sont purifiés par une CC sur silice 60 (8,5 g) pour récolter 68 fractions éluées par des mélanges Et_2O -MeOH (Tableau 60).

La fraction 22 fournit le composé **19** (0,013 g, 0,004%, Et_2O -MeOH, 95:5), les fractions 23-25 (22,5 mg, Et_2O -MeOH, 95:5) et 26-27 (6,9 mg, Et_2O -MeOH, 95:5), sont cristallisées en MeOH, pour fournir de nouveau le composé **19**. Son poids total est de 16,3 mg (0,0046%).

Tableau 60. *Chromatographie en colonne ouverte de la fraction 14-22 (213 mg) issue de la VLC*

Fraction	Eluant Et ₂ O-MeOH	Volume (ml)	Poids (mg)	Composé renfermé
1	100:0	20	7,6	mag*
2	100:0	20	51,6	
3	100:0	20	8,4	
4-5	100:0	40	6,1	
6	100:0	20	3,9	
7-10	100:0	80	6,3	
11-12	100:0	40	5	
19-20	100:0	40	1,6	
21	95:5	20	10,9	
22	95:5	20	13,3	
23-25	95:5	60	22,5	
26-27	95:5	40	6,9	
28-41	95:5	280	25,3	
42-45	95:5	80	2,9	
46-62	95:5,94:6,92:8,90:10	340	30,9	19
63-67	70:30	100	31,4	
68	0:100	100	22,9	

* mag=mélange d'acides gras

Les fractions 7-9 de la VLC: 592,8 mg sont séparés par une CC sur silice 60 (60 g) en éluant 135 fractions avec des mélanges de CHCl₃-Hex ou CHCl₃- MeOH comme solvants (Tableau 61).

Tableau 61. *Chromatographie en colonne ouverte de la fraction 7-9 (592,8 mg) issue de la VLC*

Fraction	Eluant CHCl ₃ -Hex	Volume (ml)	Poids (mg)	Composé renfermé
1-13	50:50	520	4,2	16 17, 18, mag 17 16, 17, 18, mag 17, mag
14-15	50:50	80	2	
16-18	50:50	120	29,1	
19-23	50:50	200	44,7	
24-26	50:50	120	47	
27-30	50:50	160	17,2	
31	50:50	40	7,3	
32-35	50:50	160	57	
36-39	50:50	160	24,8	
40	50:50	40	3,6	
41-53	50:50	520	24,1	
54-59	50:50	240	20,2	
60-64	50:50	200	24,4	
65-70	50:50	240	11,3	nag
71-72	50:50	80	18,8	
73-75	50:50	120	4	
76-87	50:50	480	31,7	
88-104	50:50	520	12,6	
105-116	50:50	480	5,6	
	CHCl ₃ -MeOH			
117-121	100:0	200	22,8	
122-124	100:0,99:1	120	62,4	
125-127	99:1,98:2	120	32,1	
128-133	98:2,97:3,96:4	160	54,9	
134	96:4	40	4,9	
135	0:100	150	81,9	

Les fractions 16-18 (29,1 mg) regroupées furent séparées par CPP sur silice (250 μ m)X2, 2 fois éluées avec CHCl_3 -MeOH (99,3:0,7) (Tableau 62). Cette opération a conduit à l'isolement d'un mélange d'acides gras de type $\text{CH}_3\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH}$ (0,006 g, 0,002%, R_f 0,28), le composé 17, (0,005 g, 0,002%, R_f 0,46), composé 16, (0,004 g, 0,002%, R_f 0,57) et composé 181, (0,003 g, 0,0009%, R_f 0,65).

Tableau 62. *Chromatographie sur plaque préparative de la fraction 16-18 (29,1mg) issues de la colonne ouverte faite avec 7-9 de la VLC*

Fractions 16-18*	Poids (mg)
bande 1 (R_f 0,28)	6
bande 2 (R_f 0,46) =composé 17	5
bande 3 (R_f 0,57) =composé 16	4
bande 5 (R_f 0,65) =composé 18	3
autres bandes	

* éluee par CHCl_3 -MeOH (99,3:0,7)X2

Les fractions 27-30 (17,2 mg) ont été séparées par CPP sur silice (250 μ m)X2, à l'aide de deux migrations dans CHCl_3 -MeOH (99,3:0,7). Un mélange d'acides gras $(\text{CH}_3\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH})$, 0,01g, 0,003%, R_f 0,28) et le composé 19, (0,005 g, 0,002%, R_f 0,46) sont obtenus.

Les fractions 10-11 de la colonne VLC: (229 mg) regroupées sont séparées dans une CC sur silice 60 (9 g) en éluant 109 fractions avec des mélanges de Hex-AcOEt, comme solvants (Tableau 63). Le regroupement des fractions 14-18 (0,015 g, 0,0043%, R_f 0,87 dans Hex-AcOEt 40:60) renferme un mélange de graisses insaturées. Les fractions 70-82 (9,3 mg) et 61-69 (6,8 mg) furent chromatographiées séparément par CPP sur silice (250 μ m)X2, éluées avec Et_2O pur. Un mélange des dérivés estérifiés du glycérol (0,006 g, 0,0018%, R_f 0,50) et le composé 19 (0,004 g, 0,0012%, R_f 0,37) sont isolés. Les fractions 19-35 (18,8 mg) sont séparées par une CPP sur silice (250 μ m) éluee par Hex-AcOEt 60:40 pour donner l'isolement d'un autre mélange des dérivés estérifiés du glycérol (0,010 g, 0,0028%, R_f 0,61).

Tableau 63. *Chromatographie en colonne ouverte de la fraction 10-11 (229 mg) issue de la VLC*

Fraction	Eluant Hex-AcOEt	Poids (mg)	Composé renfermé	Volume (ml)
1-5	100:0,90:10	0,8		75
6	90:10	2		15
7-8	90:10	1,8		30
9	90:10	3,8		15
10-13	90:10,80:20	21,8		60
14-18	80:20	15	mag*	75
19-30	80:20	13,5	meg†	180
31-35	80:20	5,3	meg	75
36-38	80:20	3,7		45
39-43	80:20	10,6		75
44-52	80:20	10,9		135
53-60	80:20	8,8		120
61-63	80:20	2,8	19, meg	45
64-69	80:20	4	19, meg	90
70-82	80:20	9,3	19, meg	195
83-86	80:20	2,1		60
87-103	80:20	3,8		255
104	80:20	7		15
105	50:50	12,2		15
106	50:50	3,2		15
107	50:50	2,1		15
108	50:50	1,2		15
109	MeOH pur	49,5		100

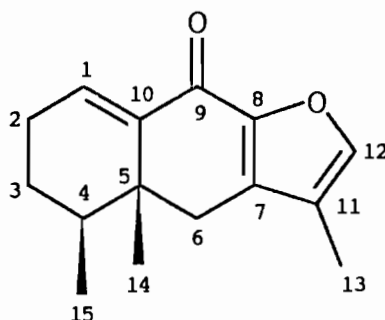
*mag=mélange d'acides gras insaturés; †: meg=mélange d'esters de glycérol

VI.3.Acétylation des withanolides

10 mg de dunawithanine G 10 furent dissous dans CH_2Cl_2 (1,5 ml) et agités à température ambiante durant 50 hrs avec Ac_2O (0,1 ml) et DMAP (20 mg). A la fin de la réaction (contrôlée par CCM), du CH_2Cl_2 est ajouté au mélange réactionnel. La solution est lavée avec une solution aqueuse de CuSO_4 puis séchée avec du Na_2SO_4 et évaporée pour donner un mélange (9,2 mg) de 10a et d'un composé minoritaire 10c. Une procédure similaire a été appliqué à 30 mg de dunawithanine H 11 (4,5 ml of CH_2Cl_2 , 0,3 ml de Ac_2O et 60 mg de DMAP) pour donner un mélange (28 mg) de 11a et le minoritaire 11c.

VI.4. Caractéristiques des composés

VI.4.1. Composé 1, ou furanérémophil-1(10)-en-9-one, de *Senecio smithioides*



1 furanérémophil-1(10)-en-9-one

Formule brute: $C_{15}H_{18}O_2$

Pf 123-124 °C;

$[\alpha]_D -31,1^\circ$ ($CHCl_3$; c 0,68);

UV $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ nm (log ϵ): 301,6 nm (3,97);

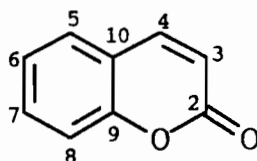
IR $\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} : 1150 (C-O), 1420 (C-O), 1600 (C=C), 1670 (C=O), 2970 (C-H), 2970 (C-H), 3100 (C=C-H)

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 230 $[M]^+$ (100), 215 (70), 201 (16), 197 (6), 187 (31), 173 (32), 161 (17), 145 (22), 141 (6), 128 (10), 123 (18), 115 (15), 107 (10)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,9 MHz): cf. Tableau 36

VI.4.2. Composés 2, 3 et 4 de *Amburana cearensis*

VI.4.2.1. Coumarine 2



2 coumarine

Formule brute: $C_9H_6O_2$;

Pf 68-69 °C;

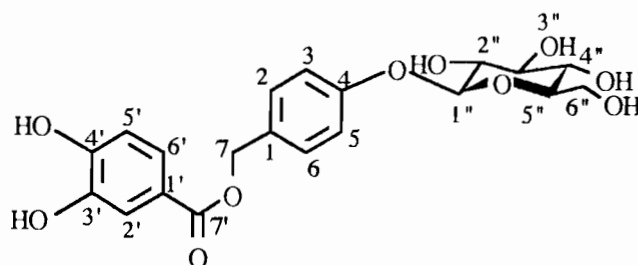
UV $\lambda_{\max}^{CHCl_3}$ nm (log ϵ): 260 nm (3,45);

IR $\nu_{\max}^{KBr}$ cm^{-1} : 1710 (lactone), 1440 (lactone), 1609 (CH aromatiques)

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 146 $[M]^+$ (87), 118 (100), 90 (43), 89 (35), 81 (6), 73 (4), 69 (15), 63 (29), 55 (12)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,9 MHz): cf. Tableau 37

VI.4.2.2. Amburoside A 3



3 amburoside A

Formule brute: $C_{20}H_{22}O_{10}$;

Pf 195-197 °C;

$[\alpha]_D -39^\circ$ (c 0.76 MeOH);

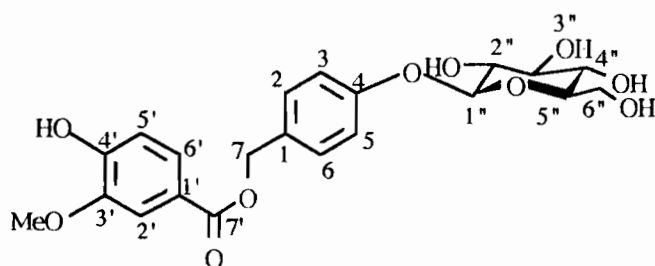
UV $\lambda_{\max}^{MeOH}$ nm (log ϵ): 220 nm (4.38);

IR $\nu_{\max}^{KBr}$ cm^{-1} : 768 and 830 ($=C-H$), 1040, 1080, 1240 and 1280 (C-O), 1510 and 1609 (C=C), 1680 (OC=O), 2900 (CH), 3340 (OH)

Masse (FAB, mode positif), m/z (rel. int.): 429 $[M+Li]^+$ (41), 419 (16), 313 (60), 303 (18), 293 (29), 267 (100), 251 (22), 228 (13), 217 (38), 209 (82), 202 (87), 187 (70)

RMN 1H ($CDCl_3$ - CD_3OD , 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$ - CD_3OD , 62,9 MHz): cf. Tableau 38

VI.4.2.3. Amburoside B 4



4 amburoside B

Formule brute: $C_{21}H_{24}O_{10}$;

Pf 130-132 °C;

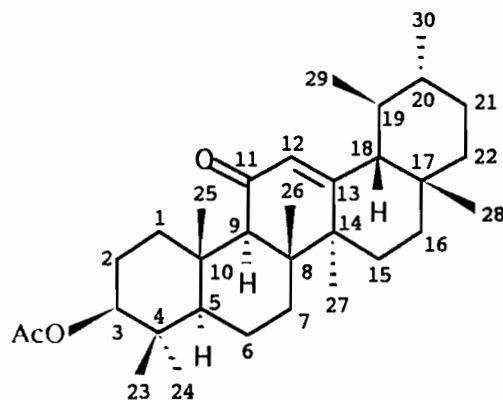
$[\alpha]_D -3^\circ$ (c 0,48 MeOH);

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 220 nm (4,28);

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 770 and 840 (=C-H), 1040, 1080, 1240 and 1280 (C-O), 1510 and 1610 (C=C), 1710 (OC=O), 2930 (CH), 3380 (OH)

Masse (FAB, mode positif), m/z (rel. int.): 443 $[M+Li]^+$ (10), 353 (8), 339 (13), 285 (11), 233 (6), 221 (11), 207 (13), 197 (17), 181 (25), 171 (25), 159 (31), 151 (75), 135 (58), 121 (100); 459 $[M+Na]^+$ (11), 413 (7), 355 (6), 308 (9), 281 (22), 221 (32), 189 (13), 173 (19), 126 (67), 121 (100)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,9 MHz): cf. Tableau 38

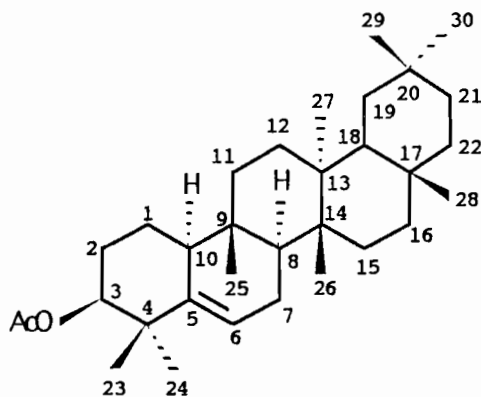
VI.4.3. Composés 5, 6 et 7 de *Qualea paraensis*VI.4.3.1. 3 β -acétoxyurs-12-en-11-one 55 3 β -acétoxyurs-12-en-11-one

Formule brute: $C_{32}H_{50}O_3$;

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 482 $[M]^+$ (19), 466 (12), 422 (7), 414 (32), 396 (12), 381 (7), 329 (10), 303 (13), 287 (6), 274 (100), 259 (50), 245 (10), 232 (50), 218 (20), 205 (32), 203 (16), 189 (31), 175 (41), 161 (35), 147 (40), 135 (83), 121 (70), 109 (85)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75,0 MHz): cf. Tableau 40.

VI.4.3.2. Acétate de glut-5-en-3 β -yl 6



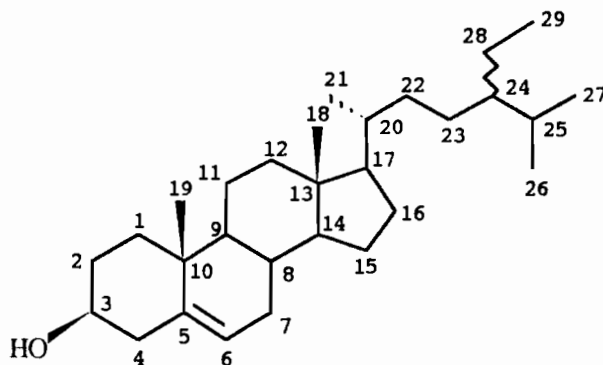
6 acétate de glut-5-en-3 β -yl

Formule brute: $C_{32}H_{52}O_2$;

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 468 $[M]^+$ (6), 453 (1), 408 (7), 393 (3), 274 (100), 259 (56), 245 (8), 218 (28), 205 (34), 173 (20), 159 (10), 150 (18), 137 (35), 134 (40), 119 (37), 109 (49)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,9 MHz): cf. Tableau 41.

VI.4.3.3. β -sitostérol 7 (= composé 17)



7 β -sitostérol

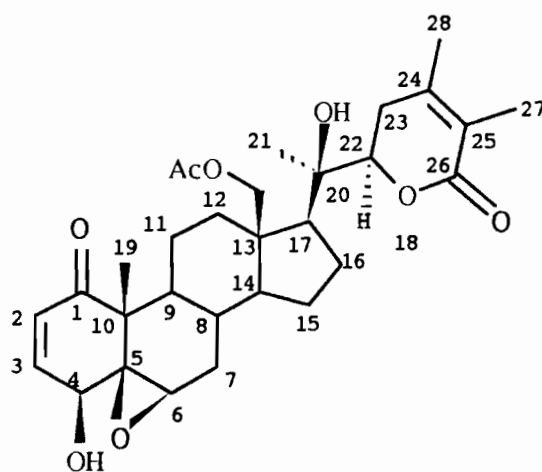
Formule brute: $C_{29}H_{50}O$;

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 414 $[M]^+$ (65), 396 (25), 381 (16), 329 (20), 303 (30), 274 (100), 259 (54), 248 (25), 245 (10), 231 (17), 219 (23), 213 (28), 205 (37), 189 (18), 173 (34), 159 (37), 149 (52), 134 (50), 119 (66), 107 (85)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,9 MHz): cf. Tableau 42.

VI.4.4. Composés 8, 9, 10, 10a, 11 et 11a, de *Dunalia brachyacantha*

VI.4.4.1. 18-acétoxywithanolide D 8



8 18-acétoxywithanolide D

Formule brute: $C_{30}H_{40}O_8$;

$[\alpha]_D +36^\circ$ ($CHCl_3$; c 0,27); (littérature: $[\alpha]_D +71,9^\circ$ ($CHCl_3$; c 5);

UV $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ nm (log ϵ): 242 (4,66);

IR $\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} : 1132 (δ lactone α,β -insaturée), 1250 (OAc), 1680 ($>C=O$), 1709 (δ lactone α,β -insaturée), 1732 (OAc), 2926 (CH), 3443 (OH);

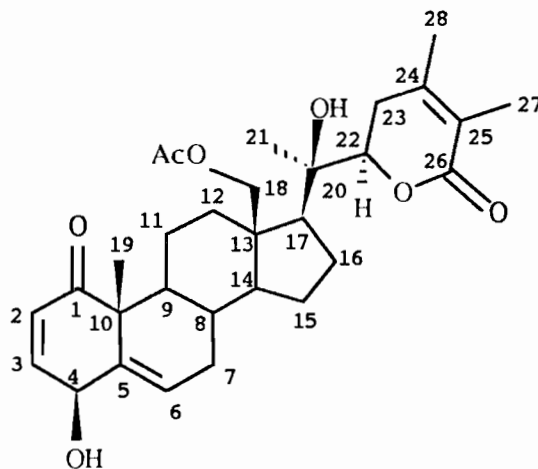
DC $[\theta]_{240} +15300$ ($CHCl_3$; c 0,0012);

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 403 (4), 385 (5), 369 (14), 343 (100), 327 (12), 325 (16), 313 (6), 300 (7), 283 (8), 257 (7), 239 (11), 215 (34), 197 (9), 181 (12), 169 (58), 159 (16), 149 (75), 126 (62), 125 (59), 124 (97)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): cf. Tableau 43.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): cf. Tableau 44.

VI.4.4.2. 18-acétoxy-5,6-déoxy-5,6-déihydro-withanolide D 9



9 18-acétoxy-5,6-déoxy-5,6-déihydro-withanolide D

Formule brute: $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_7$;

$[\alpha]_D^{+54^\circ}$ (CHCl_3 ; c 0,94); (littérature: $[\alpha]_D^{+66,3^\circ}$ (CHCl_3 ; c 4,39);

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ nm (log ϵ): 242 nm (4,52);

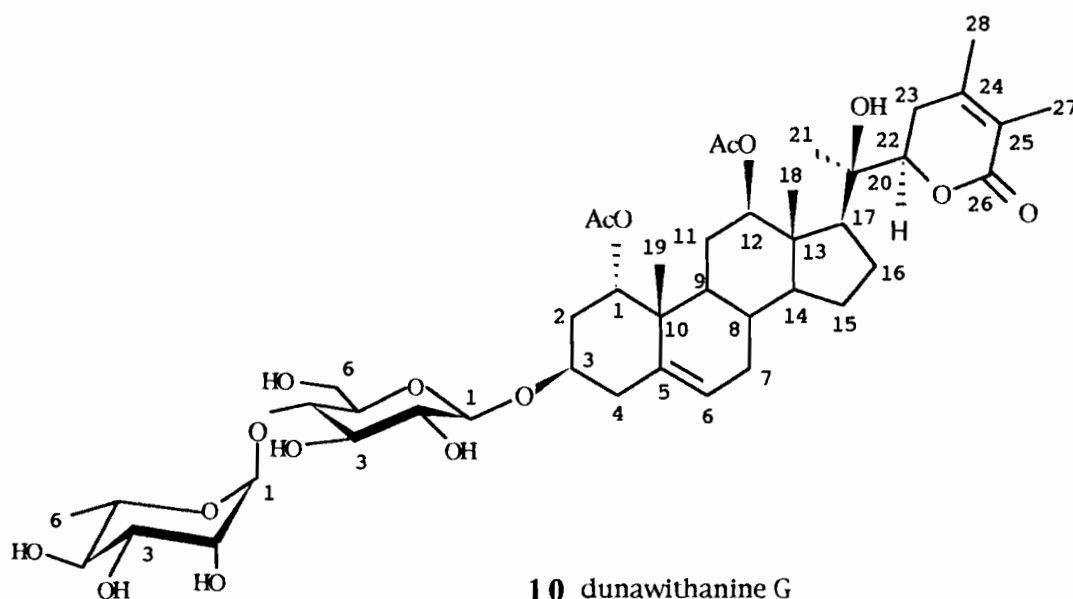
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 1128 (δ lactone α,β -insaturée), 1254 (OAc), 1694 ($>\text{C}=\text{O}$), 1705 (δ lactone α,β -insaturée), 1738 (OAc), 2936 (CH), 3437 (OH);

DC $[\theta]_{240}^{+14900}$ (CHCl_3 ; c 0,0012)

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 512 (10), 494 (27), 452 (5), 434 (15), 387 (7), 385 (10), 369 (7), 327 (82), 311 (37), 309 (21), 291 (8), 282 (11), 265 (19), 251 (12), 237 (15), 223 (19), 211 (16), 195 (14), 185 (20), 169 (73), 159 (24), 145 (31), 133 (28), 126 (96), 125 (100)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): cf. Tableau 43.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): cf. Tableau 44.

VI.4.4.3. *Dunawithanine G 10*

Formule brute: $C_{44}H_{66}O_{17}$;

$[\alpha]_D -2,5^\circ$ (MeOH; c 1,0);

UV $\lambda_{\max}^{CHCl_3}$ nm (log ϵ): 206 nm (4,96);

IR $\nu_{\max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} : 1130 (δ lactone α,β -insaturée), 1248 (OAc), 1692 ($>C=O$), 1714 (δ lactone α,β -insaturée), 1734 (OAc), 2926 (CH), 3391 (OH);

DC $[\theta]_{227} -16400$, $[\theta]_{250} +14800$ (MeOH; c 0,0012)

Masse (FAB, mode positif) NBA+LiCl m/z (rel. int.): 873 $[M+Li]^+$ (29), 752 (5), 736 (31), 720 (81), 696 (37), 663 (18), 603 (27), 577 (37), 534 (62), 466 (9), 421 (45), 383 (15), 339 (26), 307 (43), 262 (92), 209 (58);

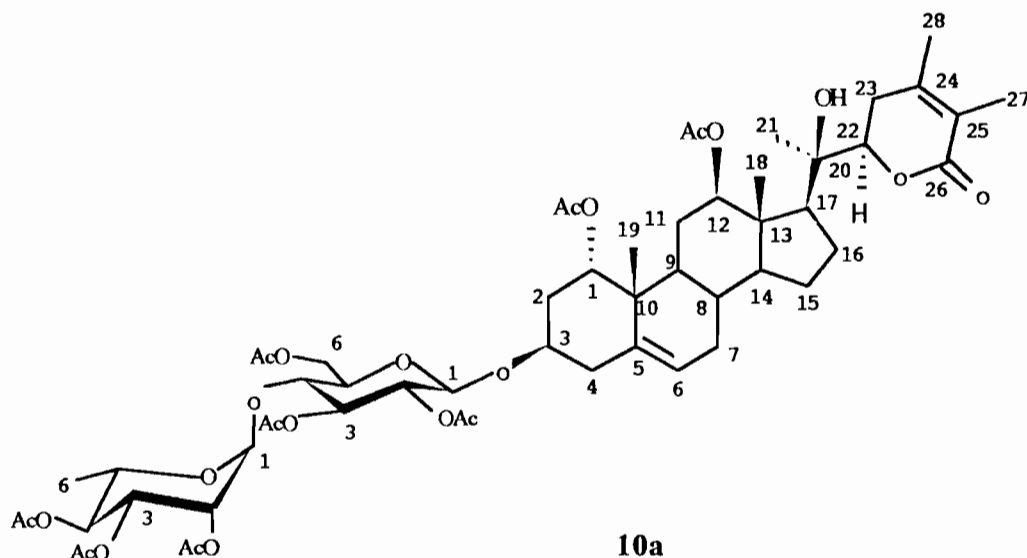
Masse (FAB, mode positif) Gly+LiCl m/z (rel. int.): 873 $[M+Li]^+$ (21), 753 (5), 593 (6), 563 (2), 547 (4), 427 (11), 369 (33), 251 (6), 175 (56), 131 (23);

Masse (FAB, mode positif) NBA m/z (rel. int.): 753 (3), 726 (20), 720 (100), 558 (9), 466 (14), 304 (68), 228 (11), 197 (7), 169 (47), 133 (45);

Masse (FAB, mode positif) Gly m/z (rel. int.): 736 (5), 696 (25), 566 (6), 534 (50), 396 (6), 369 (100), 311 (11), 280 (9), 223 (22), 169 (24), 131 (35)

RMN 1H ($CDCl_3$ - CD_3OD , 300 MHz): cf. Tableau 43.

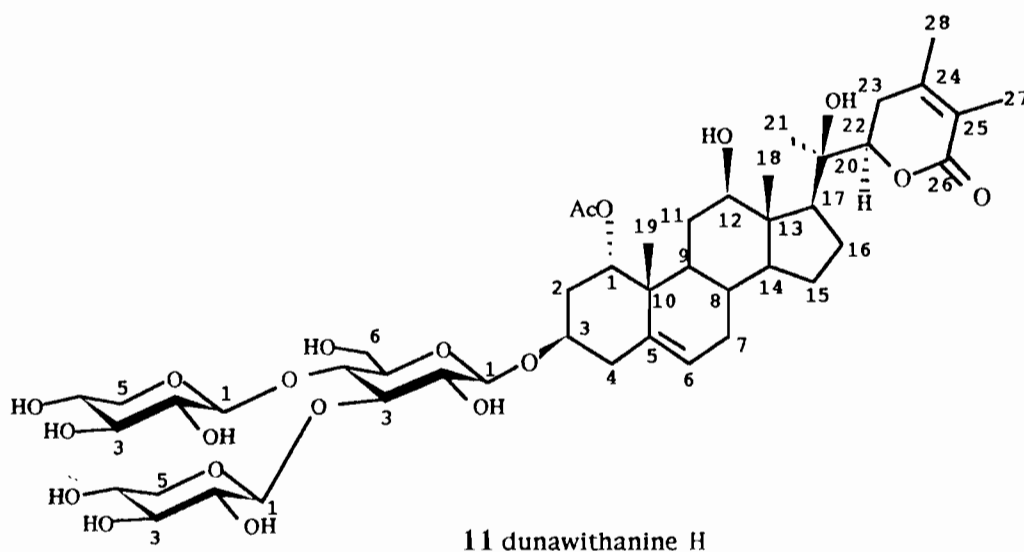
RMN ^{13}C ($CDCl_3$ - CD_3OD , 75 MHz): cf. Tableau 44.

VI.4.4.4.Dérivé peracétylé de la dunawithanine G **10a**

Formule brute: $C_{56}H_{78}O_{23}$;

Masse (LSIMS NBA+LiI) m/z (rel. int.): 1125 $[M+Li]^+$ (18), 1065 (2), 972 (4), 885 (2), 777 (1), 661 (2), 525 (2), 446 (4), 397 (23), 355 (5), 313 (18), 244 (5), 202 (24), 160 (100); Masse (MS/MS Tandem) m/z (rel. int.): 1125 $[M+Li]^+$ (100), 1066 (33), 1007 (10), 941 (13), 881 (51), 835 (6), 777 (33), 691 (5), 657 (3), 593 (20), 563 (5), 547 (7), 487 (3), 427 (17), 251 (3), 175 (28), 111 (15)

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): cf. Tableau 43.

VI.4.4.5.Dunawithanine H **11**

Formule brute: $C_{46}H_{70}O_{20}$;

$[\alpha]_D -5,3^\circ$ (MeOH; c 1,0);

UV $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ nm (log ϵ): 208 nm (5,19);

IR $\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} : 1120 (δ lactone α,β -insaturée), 1256 (OAc), 1658 ($>C=O$), 1712 (δ lactone α,β -insaturée), 2930 (CH), 3401 (OH);

DC $[\theta]_{222} -17100$, $[\theta]_{248} +5700$ (MeOH; c 0,0012)

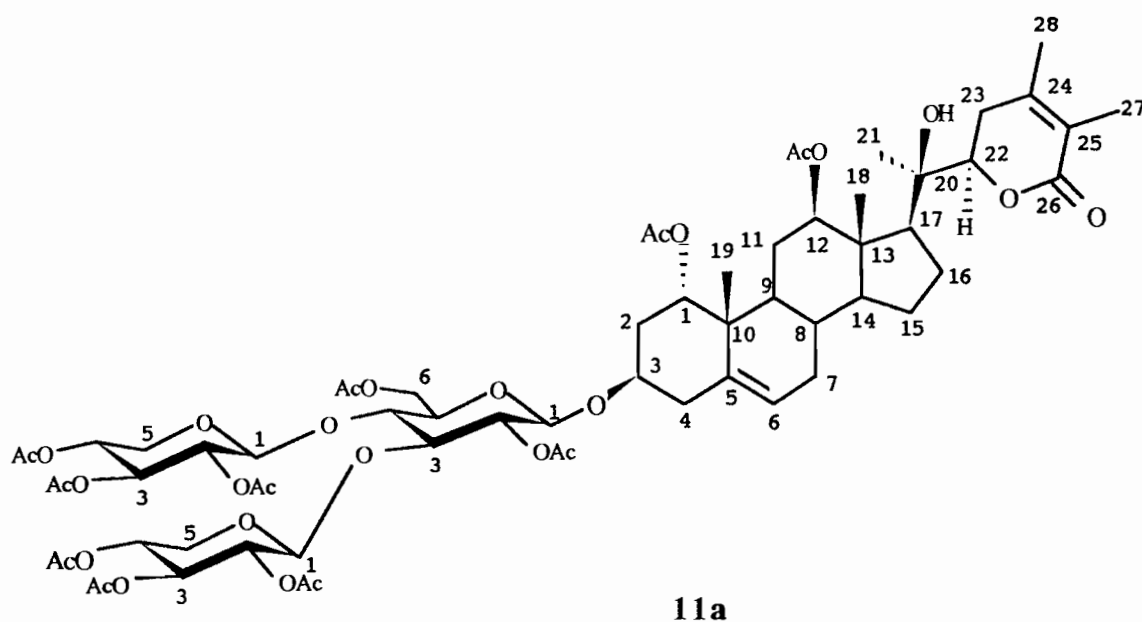
Masse (LSIMS NBA+LiI) m/z (rel. int.): 949 $[M+Li]^+$ (12), 815 (2), 736 (3), 661 (9), 617 (3), 534 (4), 455 (12), 355 (6), 319 (30), 261 (12), 207 (37), 136 (100);

Masse (MS/MS Tandem) m/z (rel. int.): 965 $[M+Na]^+$ (100), 907 (35), 905 (35), 875 (25), 861 (30), 781 (58), 755 (49), 667 (57), 567 (28), 537 (5), 479 (918), 467 (18), 461 (14), 317 (5), 173 (5)

RMN 1H (CD_3OD , 300 MHz): cf. Tableau 43.

RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz): cf. Tableau 44.

VI.4.4.6.Dérivé peracétylé de la dunawithanine H 11a



Formule brute: $C_{64}H_{88}O_{29}$;

Masse (LSIMS NBA+LiI), m/z (rel. int.): 1327 $[M+Li]^+$ (8), 1217 (2), 1015 (1), 972 (3), 883 (4), 751 (2), 661 (4), 547 (3), 446 (4), 397 (40), 313 (19), 202 (22), 160 (100);

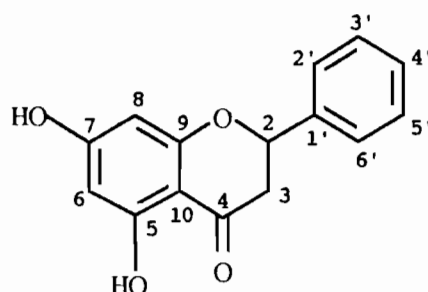
Masse (MS/MS Tandem), m/z (rel. int.): 1327 $[M+Li]^+$ (100), 1267 (78), 1209 (51), 1167 (7), 1097 (70), 1051 (37), 979 (21), 787 (21), 777 (45), 668 (5), 593 (25), 547 (2), 511 (6), 427 (22), 390(4), 251 (4), 175 (57), 97 (81)

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): cf. Tableau 43.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): cf. Tableau 44.

VI.4.5.Caractéristiques des composés **12**, **13**, **14**, et **15** de *Notholaena nivea* var. *flava*

VI.4.6.Pinocembrine **12**



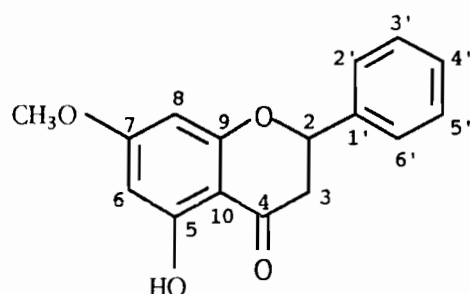
12 pinocembrine

Formule brute: $C_{15}H_{12}O_4$;

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 256 $[M]^+$ (100), 238 (8), 228 (5), 213 (5), 179 (92), 152 (92), 137 (11), 124 (55), 104 (32), 91 (27), 81 (43), 77 (31), 69 (94), 57 (49), 55 (53)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,9 MHz): cf. Tableau 46.

VI.4.6.1. Pinostrobin 13



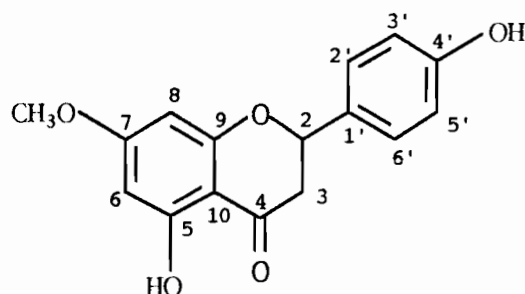
13 pinostrobin

Formule brute: $C_{16}H_{14}O_4$;

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 270 $[M]^+$ (100), 252 (6), 242 (5), 227 (4), 193 (95), 166 (81), 138 (43), 110 (16), 104 (16), 103 (19), 95 (35), 91 (14), 81 (40), 77 (26), 69 (85), 57 (33), 55 (39)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,9 MHz): cf. Tableau 46.

VI.4.6.2. Sakuranetine 14,

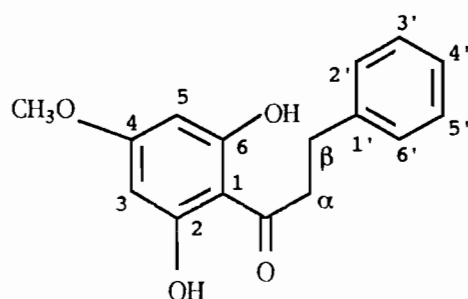


14 sakuranetine

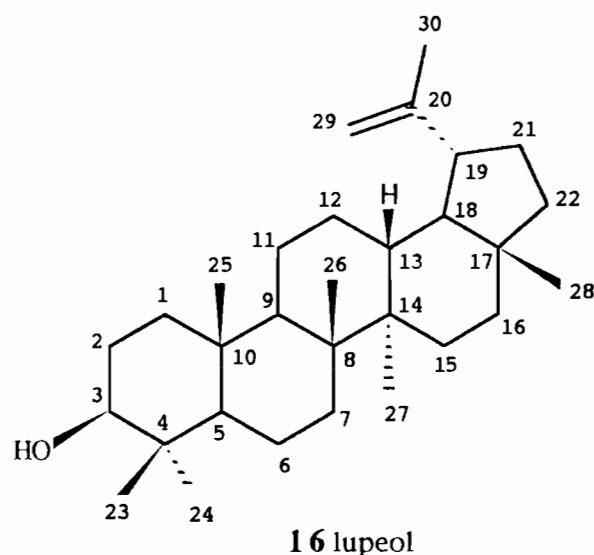
Formule brute: $C_{16}H_{14}O_5$;

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 286 $[M]^+$ (65), 269 (5), 288 (4), 236 (5), 193 (21), 192 (5), 180 (20), 167 (78), 147 (5), 134 (16), 120 (31), 91 (14), 109 (16), 97 (27), 91 (25), 81 (48), 69 (100), 57 (62), 55 (68)

RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,9 MHz): cf. Tableau 46.

VI.4.6.3.2,6-dihydroxy-4-méthoxy-dihydrochalcone **15****15**

2,6-dihydroxy-4-méthoxy-dihydrochalcone

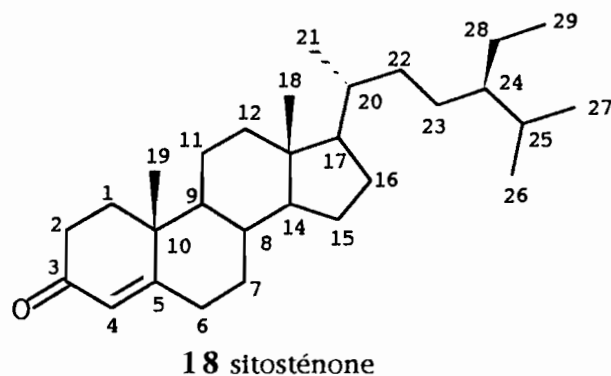
Formule brute: $C_{16}H_{16}O_4$.Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 272 $[M]^+$ (35), 255 (10), 167 (100), 140 (34), 104 (15), 91 (33), 77 (12), 69 (19)RMN 1H ($CDCl_3$, 250 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,9 MHz): cf. Tableau 46.VI.4.7. Caractéristiques des composés **16**, **18** et **19** de *Cavanillesia aff. hylogeiton*VI.4.7.1. Lupéol **16**

Formule brute: $C_{30}H_{50}O$;

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 426 $[M]^+$ (60), 411 (22), 408 (4), 393 (7), 315 (17), 299 (5), 272 (8), 257 (13), 247 (11), 234 (17), 218 (48), 207 (77), 203 (45), 190 (44), 189 (87), 176 (18), 175 (36), 161 (41), 149 (43), 147 (50), 135 (98), 133 (47), 121 (96), 119 (68), 109 (100), 107 (96), 105, (59)

RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 62,9 MHz): cf. Tableau 47.

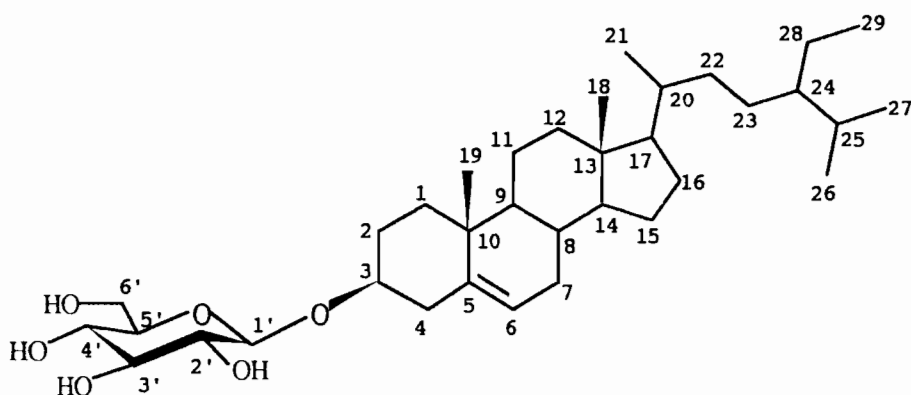
VI.4.7.2. β -sitosténone **18**



Formule brute: $C_{29}H_{48}O$;

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. int.): 412 $[M]^+$ (50), 397 (10), 384 (3), 370 (22), 355 (6), 327 (9), 298 (6), 289 (22), 271 (23), 257 (6), 245 (11), 229 (50), 215 (5), 213 (28), 203 (7), 189 (8), 175 (12), 161 (14) 149 (29), 147 (34), 135 (32), 124 (110), 107 (36)

RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125,8 MHz): cf. Tableau 48.

VI.4.7.3. 3-O- β -D-glucopyranosyl β sitostérol 1919 3-O- β -D-glucopyranosyl β -sitostérol

Formule brute: $C_{35}H_{60}O_6$;

$[\alpha]_D -15,4^\circ$ ($CHCl_3$ -MeOH, 1,0:0,2 c 0,28)

RMN 1H ($CDCl_3$ - CD_3OD , 300 MHz) et RMN ^{13}C ($CDCl_3$ - CD_3OD , 75,0 MHz): cf. Tableau 49.

VI.5. Protocoles des essais biologiques

VI.5.1. Essais antipaludiques

In vivo

L'activité antipaludique *in vivo* des extraits des plantes contre *Plasmodium berghei* et *P. vinckei*, a été déterminée par le test supressif de 4 jours.¹⁴⁵

Des souris Swiss mâles, d'un poids moyen de 20 +/- 2 g, sont contaminées avec 10^8 cellules dans une solution saline à 0,9% le jour 0. Des groupes de 5 souris ont été traités par injection intrapéritonéale du premier au troisième jour en augmentant la dose des extraits des plantes (de 100 mg/kg à 1 g/kg). Les effets supressifs ont été estimés le quatrième jour d'après l'examen des frottis sanguins colorés au Giemsa obtenus de la queue de la souris et comparés avec ceux obtenus pour un groupe témoin de souris traité avec le solvant de l'extrait (solution saline, DMSO, ou les deux). Les frottis sanguins colorés ont été examinés avec une amplification de X1000, et le pourcentage de hématies parasitées a été évalué au moins sur la base de 9000 hématies observées pour chaque concentration. Le pourcentage d'augmentation de l'inhibition du parasite a été calculé d'après la formule suivante:

$$\frac{(\text{parasitemie du contrôle} - \text{parasitemie avec drogue}) \times 100}{\text{parasitemie du contrôle}}$$

In vitro

La culture de souches chloroquino-résistantes (Indo) et chloroquino-sensibles (F32-Tanzanie) de *Plasmodium falciparum* est réalisée selon Trager et Jensen,¹⁴⁶ dans un milieu RPMI 1640, enrichi en glucose et complété avec 10% de sérum humain à 37°C.

50 µl de DMSO sont ajoutés dans des échantillons d'extraits qui sont alors solubilisés dans le milieu RPMI 1640 à l'aide d'un bain d'ultrasons. La concentration finale de DMSO ne dépasse jamais 0,1%. 150 µl de milieu de culture contenant l'extrait dilué et la suspension d'hématies humain (groupe O+, 5% d'hématocrite) avec 1% de parasitémie ont été placés dans des plaques contenant 96 réceptacles de microtitrage. Tous les tests ont été exécutés 3 fois. Après 24 heures d'incubation à 37 °C dans un incubateur contenant une bougie, le milieu est remplacé par un milieu frais avec l'extrait dilué, dont l'incubation continue pendant 48 heures. Au troisième jour du test, un échantillon de sang est pris dans chaque réceptacle et la parasitémie est évaluée. Chaque test inclue un témoin non traité avec le solvant et un témoin positif avec la chloroquine. La parasitémie de chaque réceptacle a été obtenue et le pourcentage d'inhibition de la parasitémie pour chaque concentration d'extrait est calculé par rapport au témoin non traité. Les valeurs des CI_{50} ont été déterminées graphiquement en repérant la concentration en fonction du pourcentage d'inhibition.

VI.5.2. Essais leishmanicides et trypanocides

In vitro sous la forme promastigote

Quatre souches de *Leishmania* ont été utilisées pour cette évaluation: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M 2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. donovani* (MHOM/IN/83 HS-70). Les souches de *Trypanosoma cruzi* utilisées s'appellent Tulahuen (souche Brésilienne).

Les formes promastigotes sont cultivées à 28°C dans un milieu Schneider-Drosophila, complété avec du sérum fœtal désactivé par chauffage (56°C pendant 30 minutes).¹⁴⁷ Les extraits de plante sont solubilisés dans un milieu de culture (solution saline ou DMSO) à une concentration finale égale ou inférieure à 0,1%, puis la solution est filtrée sur filtre Millipore à 0,22 µm. Les parasites dans une phase logarithmique de croissance sont déposés dans des plaques de 96 réceptacles à la concentration de 5×10^4 /ml. Chaque réceptacle est soumis pendant 72 heures, à l'exposition de l'extrait à des concentrations croissantes. L'activité est mesurée par comptage optique au microscope et comparaison avec des réceptacles témoin (qui ne contiennent pas d'extrait). La pentamidine (Aldrich®) est utilisée comme produit de référence pour évaluer l'efficacité des extraits. Tous les essais sont exécutés trois fois.

VI.5.3.Essais antibactériens

L'activité antibactérienne¹⁴⁸ est évaluée contre: *Escherichia coli* (ATCC-8739); *Shigella flexneri* (ATCC-120222); *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923/6538) et *Bacillus subtilis* (ATCC-6633) fournis par l'Institut National d'Hygiène, Santiago du Chili.

L'extrait est solubilisé dans le mélange DMSO: Eau (1:1), à des concentrations de 30 et 10 mg/ml.

Les bactéries sont incubées pendant la nuit à 37°C en utilisant des tubes de 10 ml contenant 3 ml du milieu Tryptic Soy Broth (30 g/l) et diluées à $1,5 \times 10^6$ bactéries/ml, pour déterminer la concentration inhibitrice minimale (CIM). Le test de la diffusion en boîte de Pétri avec 20 ml de milieu Tryptic Soy Agar (40 g/l) inoculé avec la suspension de bactéries (0,1 ml) est réalisé. Les réceptacles de 8 mm sont préparés et les extraits végétaux sont appliqués (0,1 ml). Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 18 hrs. Enfin la zone d'inhibition est mesurée (mm). Pour déterminer la CIM, la substance (2 mg) est solubilisée dans le milieu DMSO: Tryptic Soy Broth (4:6), et des dilutions de 1 à 0,01 mg/ml en utilisant le Tryptic Soy Broth sont préparées et testées dans des plaques de 96 réceptacles, incubées à 37°C pendant 18 hrs avant d'évaluer la croissance bactérienne.

VI.5.4.Essais antifongiques

L'activité antifongique¹⁴⁸ est évaluée contre: *Neurospora crassa*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* et *Microsporum canis*. Le milieu de culture est préparé avec la solution tampon: KH_2PO_4 (0,75 g); NaH_2PO_4 (1g); glycérol (150 ml) et H_2O (850 ml), puis stérilisé pendant 30 min. Les spores de champignons sont obtenues par lavage dans la solution tampon (1 ml): Bacto Peptona (2,5 g), Agar (15 g), saccharose (10 g) et levure (2,5 g) dans H_2O (1l), et par incubation à 30°C. Pour les dermatophytoses, les spores ($0,05 \text{ ml } 10^4 \text{ spore/ml}$) sont placées dans les réceptacles préparés dans la boîte de Pétri avec 20 ml d'Agar Sabouraud (65 g/l) et avec les substances (0,5 mg), puis on ajoute un mélange DMSO: H_2O (0,05 ml, 30:70). Le kétoconazole (100 ml, 0,025 g/l of HCl 0,1 N), est utilisé comme témoin. La boîte est soumise à incubation à 25°C pendant 10 jours et la croissance des champignons est observée chaque jour. Pour *Neurospora crassa*, les boîtes de Pétri avec l'Agar Sabouraud (20 ml) sont inoculées avec des spores (20 ml, 10^4 spores/ml). Les extraits (1, 0,5 et 0,1 mg) solubilisés dans le mélange DMSO: H_2O (0,1 ml 30:70) sont transférés dans les réceptacles (8 mm) pour incubation à 25°C pendant 20 heures, puis la zone d'inhibition est mesurée (mm). Le kétoconazole est utilisé comme témoin.

Candida albicans est soumise à incubation à 37 °C pendant la nuit dans des tubes (15 ml) avec le Tryptic Soy Broth (20 ml) et inoculée (10^6 cellules/ml) dans une boîte de Pétri avec le Tryptic Soy Agar (20 ml). Le kétoconazole est utilisé comme témoin et les extraits sont évalués comme précédemment. La CIM contre les différentes espèces de champignons est calculée selon le mode opératoire décrit précédemment.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA DE BOLIVIA
Resumen de la Información Estadística del INE-Bolivia.
www.ine.gov.bo/iwd0202.htm, 1997.
- 2- THE TIMES ATLAS OF THE WORLD
London : Times Books Ltd, 1994.
- 3- INFORME SOBRE DESARROLLO HUMANO 1998, PROGRAMA DE LAS
NACIONES UNIDAS PARA EL DESARROLLO, PNUD
Madrid : Multi-Prensa Libros s.a., 1998
- 4- MINISTERIO DE DESARROLLO SOSTENIBLE Y MEDIO AMBIENTE DE
BOLIVIA, PNUD, TRATADO DE COOPERACIÓN AMAZÓNICA
Diagnóstico sobre la información de Plantas Medicinales y de los Pueblos que las
Manejan, 1996, 10-25.
(Adresse du Ministère: Av. Arce 247, La Paz, Bolivia)
- 5- DIEZ ASTETE A
Región y Desarrollo Agrario, Asuntos Culturales y Grupos Etnicos.
La Paz : Academia Nacional de Ciencias de Bolivia, 1991.
- 6- GISPERT C, GAY J, VIDAL J A
Atlas Geográfico Universal y de Bolivia
Barcelona : Océano Grupo Editorial, S. A., 1998.
- 7- GIMENEZ A, SAUVAIN M, MUÑOZ V, BALDERRAMA L, ARRAZOLA S,
GARCIA E, BOURDY G, BERGERON S, VARGAS L, SARAVIA E, QUINTANA G,
LOPEZ A, BRAVO J A, CALLAPA J, VELASCO P, RUIZ E, RUIZ G, IRAHOLA P,
MORALES L, BALANZA E, ORTIZ B, TAE A, CHOQUE J, DEHARO E
The search of natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia.
Part I. Environmental conservation through ethnobotanical and ethnopharmacological
studies.
J Ethnopharmacol, 1999, sous presse.
- 8- ALBA J J
Estrategias de Salud y Prácticas Jampiris
In :
Los Jampiris de Raqaypampa, Centro de Comunicación y Desarrollo Andino,
CENDA.
ed por Regalsky P
Cochabamba : Colorgraf, 1993, 15-117.
- 9- BERGERON S, ORTIZ J, ORTIZ B, SORIA C
El uso de las plantas por los Chácobos (Alto Ivon, Beni, Bolivia).
La Paz : IBIS, Dinamarca, 1997.
- 10- PLAZA-MARTINEZ P, CARVAJAL-CARVAJAL J
Etnias y Lenguas de Bolivia.
La Paz : Industrias Offset Color S.R.L., 1985, 177-181.

-
- 11- BOURDY G
Tacana: ecuanasha aqui, ecuanasha id'rene cuana, me schanapaque (cultura Tacana, plantas y usos tradicionales)
La Paz : Fonama, 1999.
- 12- PHILLIPSON J D, WRIGHT C W, KIRBY G C, WARHURST D C
Phytochemistry of some plants used in traditional medicine for the treatment of protozoal diseases.
In :
Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine.
ed by Hostettmann K, Marston A, Maillard M, Hamburger M
London : Oxford Press, 1995, 37, 95-135.
- 13- WERY M
Protozoologie Médicale.
Paris : DeBoeck Université, 1995.
- 14- ROUSSET J J
Maladies Parasitaires.
Paris : Abrégés Masson, 1995.
- 15- ATIAS A
Parasitología Clínica.
Mexico D. F. : Mediterraneo, 1991.
- 16- GENTELINI M
Médecine Tropicale.
Paris : Flammarion, 1993.
- 17- MINISTERIO DE PREVISIÓN SOCIAL Y SALUD PÚBLICA DE BOLIVIA.
Informe Epidemiológico sobre Paludismo, Oficina Central de Malaria.
1992.
(Adresse du Ministère: Plaza del Estudiante S/N, La Paz, Bolivia)
- 18- BASCO L K, RUGGERI C, LE BRAS J
Molécules Antipaludiques, Mécanismes d'action, mécanismes de résistance et relations structure-activité des shizontocides sanguins.
Paris : Masson 1994.
- 19- POSNER G H, OH C H, GERENA L, MILHOUS W K
Extraordinarily potent antimalarial compounds: new structurally simple, easily synthesized, tricyclic 1,2,4-trioxanes.
J Med Chem, 1992, 35, 2459-2467.
- 20- SEVENET T
Plantes, molécules et médicaments.
In:
Dossiers Documentaires, CNRS Editions.
ed par Mourier T
Paris : Nathan, 1994, 49-54.

- 21- HOOPER M, KIRBY G C, KULKARNI M M, KULKARNI S N, NAGASAMPAGI B A, O'NEILL M J, PHILLIPSON J D, ROJATKAR S R, WARHURST D C
Antimalarial activity of parthenin and its derivatives.
Eur J Med Chem, 1990, 25, 717-723.
- 22- OHIGASHI H, HUFFMAN M A, IZUTSU D, KOSHIMIZU K, KAWANAKA M, SUGIYAMA H, KIRBY G C, WARHURST D C, ALLEN D, WRIGHT C W, PHILLIPSON J D, TIMMON-DAVID P, DELNAS F, ELIAS R, BALANSARD G
Toward the chemical ecology of medicinal plant-use in chimpanzees: the case of *Vernonia amygdalina*, a plant used by wild chimpanzees for parasite-related diseases.
J Chem Ecol, 1993, 20, 541-553.
- 23- ALLEN D, TOTH I, WRIGHT C W, KIRBY G C, WARHURST D C, PHILLIPSON J D
In vitro antimalarial and cytotoxic activities of semisynthetic derivatives of brusatol.
Eur J Med Chem, 1993, 28, 265-269.
- 24- PHILLIPSON J D, WRIGHT C W, KIRBY G C, WARHURST D C
Tropical plants as sources of antiprotozoal agents.
In :
Phytochemical potential of tropical plants.
ed by Downum K R, Romeo J T, Stafford H A
New York : Plenum Press, 1993, 1-40.
- 25- KOUMAGLO K, GBEASSOR M, NIKABU O, DE SOUZA C, WERNER W
Effects of the three compounds extracted from *Morinda lucida* on *Plasmodium falciparum*.
Planta Med, 1992, 58, 533-534.
- 26- TAWFIQ N K, ANDERSON L A, ROBERTS M F, PHILLIPSON J D, BRAY D H, WARHURST D C
Antiplasmodial activity of *Artemisia annua* plant cell cultures.
Plant Cell Rep, 1989, 8, 425-428.
- 27- EKONG R, PARTRIDGE S J, ANDERSON M M, KIRBY G C, WARHURST D C, RUSSELL P F, PHILLIPSON J D
Plasmodium falciparum effects of phaeanthine, a naturally occurring bisbenzylisoquinoline alkaloid, on chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive parasites *in vitro*, and its influence on chloroquine activity.
Ann Trop Med Parasitol, 1991, 85, 205-213.
- 28- FRANÇOIS G, BRINGMANN G, PHILLIPSON J D, ASSI L A, DOCHEZ C, RÜBENACKER M, SCHNEIDER C, WERY M, WARHURST D C, KIRBY G C
Activity of extracts and naphthylisoquinoline alkaloids from *Triphyophyllum peltatum*, *Ancistrocladus abbreviatus* and *A. barteri* against *Plasmodium falciparum* *in vitro*.
Phytochemistry, 1994, 35, 1461-1464.
- 29- WRIGHT C W, ALLEN D, CAI Y, PHILLIPSON J D, SAID I M, KIRBY G C, WARHURST D C
In vitro antiamebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from *Alstonia* roots.
Phytother Res, 1992, 6, 121-124.

- 30- WRIGHT C W, O'NEILL M J, PHILLIPSON J D, WARHURST D C, ANGENOT L, QUETIN-LECLERQ J
Antiamoebic activity of indole analogues of emetine with *in vitro* potency greater than that of emetine.
J Pharm Pharmacol, 1990, 40, 94-98.
- 31- FOURNET A, ANGELO BARRIOS A, MUÑOZ V, HOCQUEMILLER R, ROBLOT F, CAVE A, RICHOMME P, BRUNETON J
Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis.
Phytother Res, 1994, 8, 174-178.
- 32- CHEN M, CHRISTENSEN S B, BLOM J, LEMMICH E, NADELMANN L, THEANDER T G
Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*.
Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37, 2550-2556.
- 33- FOURNET A, MUÑOZ V, ROBLOT F, HOCQUEMILLER R, CAVE A, GANTIER J C
Antiprotozoal activity of dehydrozaluzanin C, a sesquiterpene lactone isolated from *Munnozia maronii* (Asteraceae).
Phytother Res, 1993, 7, 111-115.
- 34- ROBERT-GERO M, BACHRACH U, BHATNAGER S, POLONSKY J
Inhibition *in vitro* de la croissance des promastigotes de *Leishmania donovani* par des quassinoïdes.
CR Acad Sci Paris, 1985, 300, 803-806.
- 35- HOCQUEMILLER R, CORTES D, ARANGO G J, MYINT S H, CAVE A
Isolement et synthèse de l'espintanol, nouveau monoterpène antiparasitaire.
J Nat Prod, 1991, 54, 445-452.
- 36- SAUVAIN M, DEDET J P, KUNESCH N, POISSON J, GANTIER J C, GAYRAL P, KUNESCH G
In vitro and *in vivo* leishmanicidal activities of natural and synthetic quinoids.
Phytother Res, 1993, 7, 167-171.
- 37- FOURNET A, MUÑOZ V, MANJON A M, ANGELO A, HOCQUEMILLER R, CORTES D, CAVE A, BRUNETON J
Activité antiparasitaire d'alcaloïdes bisbenzylisoquinoléïques I: Activité *in vitro* sur des promastigotes de trois souches de *Leishmania*.
J Ethnopharmacol, 1988, 24, 327-335.
- 38- CAVIN J C, KRASSNER S M, RODRIGUEZ E
Plant-derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*.
J Ethnopharmacol, 1987, 19, 89-94.
- 39- FOURNET A, BARRIOS A A, MUÑOZ V, HOCQUEMILLER R, CAVE A
Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania. amazonensis* and *L. venezuelensis*.
Trop Med Parasitol, 1992, 43, 219-222.

-
- 40- CHRISTENSEN S B, CHEN M, ANDERSEN L, HJORNE U, OLSEN C E,
CORNETT C, THEANDER T G, KHARAZMI A
An antileishmanial chalcone from chinese licorice roots.
Planta Med, 1994, 60, 121-123.
- 41- FOURNET A, FERREIRA M E, ROJAS DE ARIAS A, SCHININI A, NAKAYAMA H,
TORRES S, SANABRIA R, GUINAUDEAU H, BRUNETON J
The effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on *Trypanosoma cruzi* infections in mice.
Int J Animicrob Agents, 1997, 8, 163-170.
- 42- RANG H, DALE M
Pharmacology.
New York: Churchill-Livingstone, 1987, 545.
- 43- LITTER M
Farmacognosia. 5° Ed.
Buenos Aires : El Ateneo, 1989, 43-51.
- 44- LANCINI G, PARENTI F
Antibiotics an Integrated View.
In :
Springer Series in Microbiology.
ed by Starr M P
New York : Springer-Verlag, Inc., 1982.
- 45- MENDIZABAL W
Pruebas preliminares de toxicidad y evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de
especies vegetales utilizadas en medicina tradicional.
Th : Pharm : La Paz (Université San Andrés) : 1995.
- 46- ORTIZ M
Pruebas antifúngicas y de toxicidad general en 100 especies vegetales de la etnia
Chácobo.
Th : Pharm : La Paz (Université San Andrés) : 1995.
- 47- VILLARREAL T
Evaluación de la actividad antibacteriana de plantas utilizadas por la comunidad de
Raqaypampa, provincia Mizque-Cochabamba, para su posible uso en enfermedades
diarreicas.
Th : Pharm : La Paz (Université San Andrés) : 1996.
- 48- GENEVIENE G Y
Microbiología, Hongos y Actinomicas Patógenos. 5° Ed.
México D.F. : Continental, 1975.

-
- 49- PAXTON J D
Assays for Antifungal Activity
In:
Assays for Bioactivity, vol 6
ed by Hostettmann K
In:
Methods in Plant Biochemistry.
ed by Dey P M, Harborne J B
London : Academic Press Limited : 1991, 33-46.
- 50- GOODMAN G A, GOODMAN L , RALL T S, MUTAD F
The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7° Ed.
New York : Mc Millan Publishing Co., 1985.
- 51- RAVN H, ANDARY C, KOVACS G, MØLGAARD P
Caffeic acid esters as *in vitro* inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi.
Biochem Syst Ecol, 1989, 17, 175-184.
- 52- BAILEY J A, MANSFIELD J W
Phytoalexins.
New York : Halsted Press, 1982.
- 53- CABRERA A L
El género *Senecio* (Compositae) en Bolivia.
Darwiniana, Revista del Instituto de Botánica Darwinion, 1985, 26, 81, 110.
- 54- KILLEEN T J, GARCIA E, BECK G S
Guía de Arboles de Bolivia.
La Paz : Quipus S.R.L., 1993, 462.
- 55- MUÑOZ V, SAUVAIN M, BOURDY G, CALLAPA J, BERGERON S, BRAVO J A,
BALDERRAMA L, ORTIZ B, GIMENEZ A, DEHARO E
The search of natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia.
I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians.
J Ethnopharmacol, 1999, sous presse.
- 56- BERGERON S, ORTIZ J, ORTIZ, B, SORIA C
El uso de las plantas por los Chácobos (Alto Ivon, Beni, Bolivia).
La Paz : IBIS, 1997.
- 57- KAINER K A, DURYEA M L
Tapping women's knowledge: plant resource use in extractive reserves, Acre, Brazil.
Econ Bot, 1992, 46, 408-425.
- 58- BERGERON S, ORTIZ B, ORTIZ J, SORIA C, ORTIS C
Guía Popular de las Plantas Utilizadas por la Etnia Chácobo
(Provincia Vaca-Diez, Beni)
La Paz : Fonama, 1996.
- 59- SCHULTES R E, RAFFAUF R F
The Healing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia. 2° Ed.
London : Dioscorides Press, 1992, 468.

- 60- SAGASETA DE ILDUROZ URANGA J L
La medicina está en nuestras manos. Proyecto Salud Tiraque.
Cochabamba : Ediciones Gráficas, 1996.
- 61- DE LA SOTA E R
Flora de la Provincia de Jujuy.
In :
Colección Científica del INTA, Parte II, Pteridophyta.
ed por Cabrera A L
Buenos Aires : Ediciones del INTA, 1977.
- 62- GIRAULT L
Kallawaya, guérisseurs itinérants des Andes,
Cahiers de mémoires n°107.
Paris : Editions de l'ORSTOM, 1984
- 63- DE LUCCA M, ZALLES J A
Flora medicinal de Bolivia, Diccionario Enciclopédico.
La Paz : Los Amigos del Libro, 1992.
- 64- SENEIO SMITHIODES
Recherche informatisée via Internet dans le reseau de bases de données de l'Université
d'Illinois, NAPRALERT.
(Date de la visite: 4/8/97)
- 65- KHETWAL K S, MANRAL K
Constituents of high altitude Himalayan Herbs; Part I. Furanoeremophilanes from *Senecio
arnicoides*.
Planta Med, 1988, 54, 188-189.
- 66- TORRES P, MANCHEÑO B, CHINCHILLA R, ASENSI M C, GRANDE M
New furanoeremophilanes, cacalohastin derivatives, from *Senecio linifolius*.
Planta Med, 1988, 54, 257-258.
- 67- PIETERS L A, VLIETINCK A J
Spartiodine and usaramine, two pyrrolizidine alkaloids from *Senecio vulgaris*.
Planta Med, 1988, 54, 178-179.
- 68- ASPREY G F, THORNTON P
Medicinal plants of Jamaica. III.
West Indian Med J, 1955, 4, 69-82
- 69- HAKIZAMUNGU E, VAN PUYVELDE L, WERY M
Screening of Rwandese medicinal plants for anti-trichomonas activity.
J Ethnopharmacol, 1992, 36, 143-146.
- 70- BOHLMANN F, ZDERO C, JAKUPOVIC J, MISRA L N, BANERJEE S, SINGH P,
BARUAH R N, METWALLY M A, SCHMEDA-HIRSCHMANN G, VINCENT L P D,
KING R M, ROBINSON H
Eremophilane derivatives and other constituents from *Senecio* species.
Phytochemistry, 1985, 24, 1249-1261.

-
- 71- BOHLMANN F, JAKUPOVIC J, WARNING U, GRENZ M, CHAU-THI T V, KING R M, ROBINSON H
Sesquiterpenes with new carbon skeletons, furoeremophilanes, secoeremophilanes and other constituents from Argentinian *Senecio* species.
Bull Soc Chim Belg, 1986, 95, 707-736.
- 72- JORGE NETO J, ROCHA A B, POZETTI G L
Essential oil comparative analysis of *Senecio pohlii* Schultz Bipontinus ex Baker and *Senecio brasiliensis* (Sprengel) by thin-layer chromatography and gas phase chromatography.
Rev Cien Farm, (Araraquara), 1987, 8, 89-91.
- 73- BOHLMANN F, ZDERO C, JAKUPOVIC J, GRENZ M, CASTRO V, KING R M, ROBINSON H, VINCENT L P D
Further pyrrolizidine alkaloids and furoeremophilanes from *Senecio* species.
Phytochemistry, 1986, 25, 1151-1159.
- 74- BRAVO B J A, SAUVAIN M, GIMENEZ T A, MUÑOZ O V, CALLAPA J, LE MEN-OLIVIER MASSIOT G, LAVAUD C
Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*.
Phytochemistry, 1999, 50, 71-74.
- 75- HEGNAUER R, HEGNAUER M
Leguminosae
Chemotaxonomie der Pflanzen, vol 9a
Basel : Birkhäuser-Verlag, 1994, 344
- 76- CLARK STILL W, KAHN M, MITRA A
Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution.
J Org Chem, 1978, 43, 2923-2925.
- 77- COLL J C, BOWDEN B F
The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures.
J Nat Prod, 1986, 49, 934-936.
- 78- CORREA D B, GUERRA L F B, GOTTLIEB O R, MAIA J G
C-Methyl phenolics from *Qualea* species.
Phytochemistry, 1981, 20, 305-307.
- 79- LOPES J L C, LOPES J N C, FILHO H F L
5-Deoxyflavones from the Vochysiaceae.
Phytochemistry, 1979, 18, 362.
- 80- CONTA A G, ALBONICO S M, JULIANI H R
Aislamiento de withaferina de algunas especies argentinas de *Acnistatus* y *Dunalia*.
Anales Asoc Quim Argentina, 1971, 59, 373-375.
- 81- ADAM G, CHIEN N Q, KHOI N H
Dunawithanines A and B, the first withanolide glycosides from *Dunalia australis*.
Phytochemistry, 1984, 23, 2293-2297.

-
- 82- LISCHEWSKI M, HANG N T B, PORZEL A, ADAM G, MASSIOT G, LAVAUD C
Withanolide glycosides from *Dunalia australis*.
Phytochemistry, 1992, 31, 939-942.
- 83- LAVIE D, KIRSON I, GLOTTER E
Constituents of *Withania somnifera* Dun. Part X.
The structure of withanolide D.
Isr J Chem, 1968, 6, 671-678.
- 84- KIRSON I, LAVIE D, ALBONICO M, JULIANI H R
The withanolides of *Acnistus australis* (Griseb.)
Tetrahedron, 1970, 26, 5062-5069.
- 85- LISCHEWSKI L, HANG N T B, PORZEL A, ADAM G, MASSIOT G, LAVAUD C
Withanolides from *Dunalia australis*.
Phytochemistry, 1991, 30, 4184-4186.
- 86- KIRSON I, GLOTTER E
Recent developments in naturally occurring ergostane-type steroids. A review.
J Nat Prod, 1981, 44, 633-647.
- 87- LUIS J G, ECHEVERRI F, GONZALES A G
Acnistins C and D, withanolides from *Dunalia solanacea*.
Phytochemistry, 1994, 36, 1297-1301.
- 88- LUIS J G, ECHEVERRI F, GONZALES A G
Acnistins F-H, withanolides from *Dunalia solanacea*.
Phytochemistry, 1994, 36, 769-772.
- 89- RAY A B, GUPTA M
Withasteroids, a Growing Group of Naturally Occurring Steroidal Lactones.
In :
Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 63
Ed; Herz W, Kirby G W, Moore R E, Steglich W, Tamm Ch,
Wien and New York : Springer-Verlag, 1994.
- 90- GLOTTER E
Withanolides and related ergostane-type steroids.
Nat Prod Rep, 1991, 8, 414-440.
- 91- KUPCHAN S M, ANDERSON W K, BOLLINGER P, DOSKOTCH R W, SIMTH R M,
SAENZ RENAULD J A, SCHNOES H K, BURLINGAME A L, SMITH D H
Tumor inhibitors. XXXIX. Active principles of *Acnistus arborescens*. Isolation and
structural and spectral studies of withaferin A and withacnistin.
J Org Chem, 1969, 34, 3858-3866.
- 92- ANTOUN M D, ABRAMSON D, TYSON R L, CHANG C, Mc LAUGHLIN J L,
PECK G, CASSADY J M
Potential antitumor agents. Physalin B and 25,26-Epidihydro-physalin C from
Witheringia coccoloboides.
J Nat Prod, 1981, 44, 579-585.

-
- 93- BUDHIRAJA R D, SUDHIR S, GARG K N
Antiinflammatory activity of 3 β -hydroxy-2,3-dihydrowithanolide F.
Planta Med, 1984, 50, 134-135.
- 94- BUDHIRAJA R D, GARG K N, SUDHIR S
Protective effect of 3 β -hydroxy-2,3-dihydrowithanolide F against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity.
Planta Med, 1986, 28-30.
- 95- BAHR V, HÄNSEL R
Immunomodulating properties of 6 α ,7 α -epoxy-5,20 α -(R)-dihydroxy-1-oxo-(5 α)-witha-2,24-dienolide and solasodine.
Planta Med, 1982, 44, 32.
- 96- CHEN Z L, WANG B D, CHEN M Q
Steroidal bitter principles from *Tacca plantaginea*. Structures of taccalonolide A and B.
Tetrahedron Lett, 1987, 28, 1673-1676.
- 97- RAFFAUF R F, SHEMLUCK M J, LE QUESNE P W
The withanolides of *lochroma fuchsioides*
J Nat Prod, 1991, 54, 1601-1606.
- 98- NOTHOLAENA NIVEA VAR. FLAVA
Recherche informatisée via Internet dans le reseau de bases de données de l'Université d'Illinois, NAPRALERT.
(Date de la visite: 14/7/98)
- 99- WOLLENWEBER E, DOERR M, WATON H, FAVRE-BONVIN J
Flavonoid aglycones and a dihydrostilbene from the frond exudate of *Notholaena nivea*.
Phytochemistry, 1993, 33, 611-612.
- 100- HEGNAUER R
Bombacaceae
Chemotaxonomie der Pflanzen, vol 3
Basel : Birkhäuser-Verlag, 1964.
- 101- HEGNAUER R
Bombacaceae
Chemotaxonomie der Pflanzen, vol 8
Basel : Birkhäuser-Verlag, 1989.
- 102- HEGNAUER R
Bombacaceae
Chemotaxonomie der Pflanzen, vol 9
Basel : Birkhäuser-Verlag, 1990.
- 103- MARTIN G E, ZEKTZER A S
Two-Dimensional NMR Methods for Establishing Molecular Connectivity: a Chemist's Guide to Experiment Selection, Performance, and Interpretation.
New York : VCH publishers, 1988.

-
- 104- CANET D
La RMN Concepts et méthodes
Paris : InterEditions, 1991.
- 105- MASSIOT G, LAVAUD C
Structural Elucidation of Saponins.
In :
Structure and Chemistry (Part C), vol 15
Studies in Natural Products Chemistry,
ed by Rahman A U
Amsterdam : Elsevier Science B.V., 1995, 187-224.
- 106- SANDERS J K M , HUNTER B K
Modern NMR Spectroscopy, A Guide for Chemists.
Oxford : Oxford University Press, 1989.
- 107- FRIEBOLIN H
Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy.
Weinheim : VCH publishers, 1993.
- 108- DE HOFFMANN E, CHARETTE J, STROOBANT V
Spectrométrie de Masse.
Paris : Masson, 1994.
- 109- GHISALBERTI E L
The Chemistry of Unusual Terpenoids from the Genus *Eremophila*.
In :
Studies in Natural Products Chemistry (Part C), vol 15
ed by Rahman A U,
Amsterdam : Elsevier, 1995, 225-287.
- 110- BOLHMANN F, ZDERO C, GRENZ M
Natürlich vorkommende Terpen-Derivative, XXXIX,
Über die Inhaltsstoffe der Gattung *Euryops*.
Chem Ber, 1974, 107, 2730-2759.
- 111- DUPRE S, GRENZ J, JAKUPOVIC J, BOLHMANN F, NIEMEYER H M
Eremophilane, germacrene and shikimic acid derivatives from Chilean *Senecio* species.
Phytochemistry, 1991, 30, 1211-1220.
- 112- PRETSCH E, SIMON W, SEIBL J, CLERC T
Tables of Spectral Data for Structural Determination of Organic Compounds, ¹³C-NMR, ¹H-NMR, IR, MS, UV/VIS. 2nd ed.
In :
Chemical Laboratory Practice.
ed by Fresenius W, Huber J F K, Pungor E, Rechnitz G A, Simon W, West Th S
Berlin; Heilderberg : Springer-Verlag, 1989, H345.
- 113- OZAWA T, TAKINO Y
Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of phenolic glycosides isolated from chestnut galls
Agr Biol Chem, 1979, 43, 1173-1177.

-
- 114- CHALLICE J S, WILLIAMS A H
Phenolic compounds of the genus *Pyrus*-I. The occurrence of flavones and phenolic acid derivatives of 3,4-dihydroxybenzyl alcohol 4-glucoside in *Pyrus calleryana*.
Phytochemistry, 1968, 7, 119-130.
- 115- FINUCANE B W, THOMSON J B
Triterpenoids. Part VIII. Allylic oxidation by N-Bromosuccinimide.
J Chem Soc Perkin I, 1972, 1856-1862.
- 116- BANDARANAYAKE W
Terpenoids of *Canarium zeylanicum*
Phytochemistry, 1980, 19, 255-257.
- 117- YAGISHITA K, NISHIMURA M
The chemical structure of neoilexonol.
I. Some properties of a new triterpenoid ketoalcohol isolated from the bark of *Ilex goshiensis* Hayata.
Agr Biol Chem, 1961, 25, 517-518.
- 118- WEHRLI F W, NISHIDA T
The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy.
Fortsch Chem Org Naturst, 36, 89, 91.
- 119- BUDZIKIEWICZ H, WILSON J M, DJERASSI C
Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes.
J Am Chem Soc, 1963, 85, 3688-3699.
- 120- AKIHISA T, YAMAMOTO K, TAMURA T, KIMURA Y, IIDA T, NAMBARA T, CHANG F C
Triterpenoid ketones from *Lingnania chungii* McClure: Arborinone, friedelin and glutinone.
Chem Pharm Bull, 1992, 40, 789-791.
- 121- MATSUNAGA S, TANAKA R, AKAGI M
Triterpenoids from *Euphorbia maculata*.
Phytochemistry, 1988, 27, 535-537.
- 122- BUDZIKIEWICZ H, BRAUMAN J I, DJERASSI C
Massenspektrometrie und ihre Anwendung auf Strukturelle und Stereochemische probleme - LXVII
Zum retro-Diels-Alder-zerfall Organischer Moleküle unter Elektronenbeschuss.
Tetrahedron, 1965, 21, 1855-1879.
- 123- MIJARES A, CARGILL D I, GLASEL J A, LIEBERMAN S
Studies on C-20 epimers of 20-Hydroxycholesterol
J Org Chem, 1967, 32, 810-812.
- 124- VANDE VELDE V, LAVIE D
New withanolides of biogenetic interest from *Withania somnifera*
Phytochemistry, 1981, 20, 1359-1363.
- 125- ADAM G, HESSE M

-
- Strukturaufklärung eines C₂₈-steroidlactons vom withaferin-typ aus *Dunalia australis* (Griseb.) Sleumer.
Tetrahedron, 1972, 28, 3527-3534.
- 126- RECK G, KHOI N H, ADAM G
(20R:22R)-1 α ,3 β ,20-trihydroxy-witha-5,24-dienolide monohydrate (Dunawithagenine monohydrate) C₂₈H₄₂O₅·H₂O.
Cryst Struct Comm, 1982, 11, 355-364.
- 127- JUNG J H, PUMMANGURA S, CHAICHANTIPYUTH C, PATARAPANICH C, McLAUGHLIN J L
Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum*.
Phytochemistry, 1990, 29, 1667-1670.
- 128- BURKE B, NAIR M
Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of jamaican *Piper* species.
Phytochemistry, 1986, 25, 1427-1430.
- 129- BAUDOUIN G, TILLEQUIN F, KOCH M
Isolèment, structure et synthèse de la vochysine, pyrrolidinoflavanne de *Vochysia guianensis*.
J Nat Prod, 1983, 46, 681-687.
- 130- MABRY T J, MARKHAM K R
Mass Spectrometry of Flavonoids
In :
The Flavonoids.
ed by Harborne J B, Mabry T J, Mabry H
London : Chapman and Hall, 1975, 100-103.
- 131- BOHM B
The Minor Flavonoids.
In :
The Flavonoids
Advances in Research Since 1980.
ed by Harborne J B
London; New York : Chapman and Hall, 1988, 348.
- 132- RAZDAN T K, HARKAR S, QADRI B, QURISHI M A, KHUROO M A
Lupene derivatives from *Skimmia laureola*.
Phytochemistry, 1988, 27, 1890-1892.
- 133- BUDZIKIEWICZ H, DJERASSI C, WILLIAMS D H
Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, vol 2
Steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes.
San Francisco : Holden-Day, Inc., 1964
- 134- NES W D, NORTON R A, BENSON M
Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [¹³C]mevalonates.
Phytochemistry, 1992, 31, 805-811.
- 135- GASPAR E M M, DAS NEVES H J C

Steroidal constituents from mature wheat straw.
Phytochemistry, 1993, 34, 523-527.

- 136- BROWN F J, DJERASSI C
Elucidation of the course of the electron impact induced fragmentation of α,β -unsaturated 3-keto steroids.
J Am Chem Soc, 1980, 102, 807-817.
- 137- GOAD L J
Phytosterols.
In :
Methods in Plant Biochemistry, vol 7
ed by Dey P M, Harborne J B
London : Academic Press Limited, 1991, 369-434.
- 138- DIJOUX M G
Saponines et flavonoïdes de *Beta vulgaris* L.
Th : Pharm : Reims : 1993.
- 139- IRIBARREN A M, POMILIO A B
Components of *Bauhinia candicans*.
J Nat Prod, 1983, 46, 752-753.
- 140- IRIBARREN A M, POMILIO A B
Sitosterol 3-O- β -D-xylopyranoside from *Bauhinia candicans*.
Phytochemistry, 1984, 23, 2087-2088.
- 141- IRIBARREN A M, POMILIO A B
Sitosterol 3-O- α -D-riburonofuranoside from *Bauhinia candicans*.
Phytochemistry, 1985, 24, 360-361.
- 142- IRIBARREN A M, POMILIO A B
Sitosterol 3-O- α -D-xyluronofuranoside from *Bauhinia candicans*
Phytochemistry, 1987, 26, 857-858.
- 143- PEI-WU G, FUKUYAMA Y, REI W, JINXIAN B, NAKAGAWA K
An acylated sitosterol glucoside from *Alisma plantago-aquatica*.
Phytochemistry, 1988, 27, 1895-1896.
- 144- JARES E A, TETTAMANZI M C, POMILIO A B
Sitosterol 3-O- β -D-glucuronopyranoside from *Senecio bonariensis*.
Phytochemistry, 1990, 29, 340-341.
- 145- PETERS W
Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria.
New York : Academic Press, 1970, 64-136.
- 146- TRÄGER W, JENSEN J B
Human malaria in continuous culture.
Science, 1976, 193, 673-675.

-
- 147- MUÑOZ V, MORETTI C, SAUVAIN M, CARON C, PORZEL A, MASSIOT G, RICHARD B, LE MEN-OLIVIER L
Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanian and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (Muell. Arg. L. Allorge, (Syn. *Tabernaemontana van Heurkii*). *Planta Med*, 60, 455-459.
- 148- GIMENEZ A, ESTEVEZ T, IRAHOLA P, VELASCO P, BALDERRAMA L, MORALES L, BRAVO J, MUÑOZ V, RUIZ E, BALANZA E, GARCIA E, QUINTANA G, VARGAS L, ARRAZOLA S, SARAVIA E, LOPEZ A, SUAREZ E, SAUVAIN M, DEHARO E, BERGERON S
Conservación ambiental a través de la valoración etnobotánica y etnofarmacológica en Bolivia.
Rev Bol Quím, 13, 35-49.

JOSE-ANTONIO BRAVO-BARRERA

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

Th. Pharm. Univ. : REIMS : 1999

Résumé:

L'étude phytochimique bioguidée par des essais antipaludiques, antileishmaniens, antichagasiqes, antimycosiques et antibactériens de six plantes boliviennes a été réalisée. Les espèces sont récoltées suite à une recherche ethnobotanique concernant des informations ethnomédicales provenant de trois ethnies boliviennes minoritaires:

-l'ethnie Chácobo: *Amburana cearensis* (Fabaceae) et *Qualea paraensis* (Vochysiaceae),

-l'ethnie Raqaypampeños: *Dunalia brachyacantha* (Solanaceae) et *Notholaena nivea* var. *flava* (Pteridaceae),

-l'ethnie Tacanas: *Cavanillesia aff. hylogeiton* (Bombacaceae)

et de la pharmacopée Kallawaya: *Senecio smithioides* (Asteraceae).

Quinze extraits de diverses polarités ont été obtenus au moyen de percolations et macérations, et ont été évalués contre *Plasmodium falciparum*, *P. berghei*, *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. donovani*, *Trypanosoma cruzi*, *Neurospora crassa*, *Candida albicans*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* et d'autres souches de champignons et bactéries. Dix-huit composés ont été isolés et caractérisés au moyen des diverses techniques d'analyses spectroscopiques, cinq structures nouvelles ont été établies. Ces composés ont été testés de la même façon à l'aide des tests biologiques déjà mentionnés. Les résultats les plus importants concernent un sesquiterpène antipaludique, deux withanolides à activités trypanocide et leishmanicide et deux flavanones antifongiques.

Rubrique: PHARMACIE - Pharmacognosie

Mots clés: analyse spectrale, pharmacognosie, médecine traditionnelle, composés plantes, antiparasitaires, antibactériens, antifongiques, Bolivie

Jury:

Mme Monique ZECHES-HANROT	Président
Mr. Joseph CONNOLLY	Rapporteur
Mr. Georges MASSIOT	Rapporteur
Mme Mireille HONTEBEYRIE	
Mr. Michel SAUVAIN	
Mr. Alberto GIMENEZ	
Mlle Catherine LAVAUD	Directeur

Adresse de l'auteur:

Mr. José-Antonio BRAVO-BARRERA
c. Estados Unidos 1166
La Paz, Bolivie