

THESE

Présentée

devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse

en vue de l'obtention

du **Doctorat de l'Université Paul Sabatier**

Spécialité : Chimie pour la Santé

par

Sandra Ibañez Calero

**APPLICATION DU TEST D'INHIBITION DE LA
BIOCRISTALLISATION DE L'HEME A LA CARACTERISATION DE
COMPOSES ANTIPALUDIQUES ISOLES DE LA FLORE DE BOLIVIE**

Soutenue le 05/10/2005, devant la commission d'examen :

Pr LEWIN G, Université Paris XI, Châtenay-Malabry	Rapporteur
Pr BALANSARD G, Université de la Méditerranée, Marseille	Rapporteur
Pr BRAVO J., Université de La Paz, Bolivie	Examineur
Dr ANDRE-BARRES C., Chargée de recherche au CNRS, Toulouse	Examineur
Dr JULLIAN V., Chargée de recherche à l'IRD, Toulouse	Examineur
Pr VALENTIN A., Université Paul Sabatier, Toulouse	Examineur
Dr SAUVAIN M., Directeur de Recherche à l'IRD, Toulouse	Directeur de thèse

DÉDICATION

Cette thèse est dédiée à mes jumeaux Javier Andrés y Sandra Natalia dont les sourires ont illuminé ce travail même à distance... Je désire également dédié ce travail à mon mari Javier, lequel s'est toujours intéressé à tous mes projets et qui m'a soutenu en me donnant l'amour, la valeur et l'énergie pour arriver à la fin de ce défi.

Finalement, je dédie cette thèse à ma chère maman « Viquisa » et à mes beaux-parents Elba et Javier qui, durant mes longues absences, ont surveillé mon foyer...

Je vous aime beaucoup

Sandra

REMERCIEMENTS

L'auteur désire remercier le Dr. Michel SAUVAIN pour son appui, sa patience et pour m'avoir guidé tout au long de ce travail. De même je lui suis infiniment reconnaissante pour l'opportunité qu'il m'a donnée de réaliser un rêve que j'avais, réaliser le doctorat dans un endroit plein d'histoire, de beauté et de technologie comme Toulouse. De plus, je désire remercier mes amis de France : Valérie Jullian, Séverine Maurel et George Massiot pour leurs conseils durant ce travail. Des remerciements spéciaux à la famille Sauvain pour l'amitié et l'affection qu'elle me donna pendant mes séjours dans son foyer. En Bolivie, je désire remercier mes amis Evelyne Lara, Cecilia Ibáñez, Andrea Ibáñez, Rosaura de Michel, Patricia Oporto, Grace Ruiz, Stephan Beck, Alberto Gimenez y Jose Bravo pour la collaboration et le dévouement à cette thèse.

Une reconnaissance spéciale à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) pour la bourse octroyée, au programme Pal+ du Ministère de la Recherche, à l'UMR 152 IRD-UPS à la Faculté de Pharmacie de Toulouse III (Université Paul Sabatier - UPS), au groupe de RMN de l'UPS, à la carrière des Sciences Chimiques de la UMSA (Université Mayor de San Andrés), à l'Institut de Recherche Pharmac Biochimique (UMSA), à l'Herbier National de la Bolivie (UMSA) et à toutes les personnes qui sont en relation avec ses institutions et qui d'une façon ou d'une autre m'ont offert leur appui.

À vous tous merci

PRÉFACE

“Maintenant, les chimistes peuvent prendre des molécules spéciales, comme la fragrance des violettes, les analyser et nous indiquer l'arrangement exact de leurs atomes dans l'espace. Nous savons que le dioxyde de carbone est droit et symétrique : O-C-O (lequel peut être également déterminé facilement par des méthodes physiques). Cependant, même pour le plus complexe des arrangements d'atomes qui existe en chimie, on peut, moyennant un long et impressionnant travail de détective, trouver l'arrangement desdits atomes...

Comment le chimiste peut-il trouver l'arrangement des atomes ? Il mélange des bouteilles pleines de choses, et si celle-ci se change en rouge, cela lui indique qu'elle possède un hydrogène et deux carbones unis entre eux. D'un autre côté, si celle-ci se change en bleu, cela lui indique que ce n'est pas l'arrangement correct. Ceci est une des pièces les plus extraordinaire d'un travail de détective : la chimie organique.

..Le physicien ne peut jamais croire complètement ce que le chimiste sait et ce dont il parle lorsqu'il décrit l'arrangement des atomes. Pendant près de 20 ans, il a été possible, dans plusieurs cas, de regarder ces molécules moyennant une méthode physique et il a été possible de localiser chaque atome, non pas par l'observation des couleurs mais par la mesure d'où se trouvent ces derniers. “And lo and behold !, les chimistes sont presque toujours exacts”.

R.P. Feynmann

The Feynman Lectures on Physics; vol.1, p. 1-7, 1963.

TABLE DES MATIERES

	Page
PARTIE I. LE PALUDISME	1
1. Introduction	1
2. Antécédents	3
<i>A. Biologie du paludisme</i>	3
<i>B. Prévalence du paludisme</i>	5
<i>C. Rappel historique sur la genèse des produits naturels antipaludiques</i>	9
<i>D. Rappel sur la genèse des produits de synthèse antipaludiques</i>	28
<i>E. Rappel sur la genèse des évaluations pharmacologiques antipaludiques</i>	31
<i>F. Mécanismes et cibles d'action</i>	32
 PARTIE II. À LA RECHERCHE D'INHIBITEURS DE LA FORMATION D'HEMOZOINE (FBIT) EN BOLIVIE	 41
1. Antécédents	41
<i>A. Catabolisme de l'hémoglobine</i>	41
<i>B. Formation de l'hémozoïne</i>	42
<i>C. Propriétés de l'hémozoïne</i>	43
<i>D. Inhibition de l'Agrégation de l'Hème –Essais</i>	48
<i>E. Inhibiteurs de l'agrégation de l'hème et leurs mécanismes d'action</i>	49

	Page
2. Le paludisme en Bolivie et la recherche d'antipaludiques	57
<i>A. Les caractéristiques géographiques et climatiques de la Bolivie</i>	57
<i>B. Persistance du paludisme en Bolivie</i>	58
<i>C. La Bolivie et la recherche antipaludique</i>	62
 PARTIE III. RESULTATS EXPERIMENTAUX DES ESPÈCES PROVENANT DE LA VALLE DE ZONGO.	 70
1. Collectes dans la Vallée de Zongo	70
2. Criblage pharmacologique des espèces collectées dans la Vallée de Zongo	76
3. Séparation et identification d'inhibiteurs de FPIX isolés de <i>Brachyotum microdon</i> (Melastomataceae)	89
<i>A. Antécédents</i>	89
1. Information Botanique	89
2. Information Chimique et Biologique	90
<i>B. Séparation bioguidée</i>	91
4. Séparation et identification d'inhibiteurs de FPIX isolés de <i>Rumex obtusifolius</i> L (Polygonaceae)	97
<i>A. Antécédents</i>	97
1.- Information Botanique	97
2.- Information Chimique et Biologique	100
<i>B. Séparation bioguidée</i>	100

	Page
PARTIE IV. TRAVAUX SUPPLÉMENTAIRES SUR DES ESPÈCES AMAZONIENNES	102
1. Intérêts d'étudier des espèces amazoniennes	102
2. Séparation et identification d'inhibiteurs de FPIX isolés de	
<i>Gustavia augusta</i> (Lecythidaceae)	104
A. Révision bibliographique	104
B. Séparation bioguidée	104
3. Identification d'inhibiteurs de FPIX en <i>Bowdichia virgiloides</i>	
(Leguminosae)	106
A. Information Botanique	106
B. Information bibliographique	107
C. Fractions de <i>Bowdichia virgiloides</i>	108
 PARTIE V. DETERMINATION DES STRUCTURES DES COMPOSES ACTIFS	
ISOLES DES PLANTES ÉTUDIÉES	109
1. Composés actifs isolés de <i>Brachyotum microdon</i> (Melastomataceae)	109
A. Composé C1: alcool gras	109
1.- Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	109
2.- Données de Spectrométrie de Masse (SM)	110
B. Composé C2: β -sitostérol	111
1.- Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	111
2.- Données de Spectrométrie de Masse (SM)	119

<i>C. Composé C3: acide oléanolique</i>	121
1.- Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	121
2.- Données de Spectrométrie de Masse (SM)	134
3.- Données d'Infra Rouge (IR)	136
4.- Données de Rotation Spécifique ($[\alpha]_D^{25}$)	136
<i>D. Composé C4: acide ursolique</i>	137
1.- Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	137
2.- Données de Spectrométrie de Masse (SM)	151
3.- Données d'Infra Rouge (IR)	151
4.- Données de Rotation Spécifique ($[\alpha]_D^{25}$)	152
<i>E. Composé C5: acide corosolique</i>	153
1.- Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	153
2.- Données de Spectrométrie de Masse (SM)	166
3.- Données d'Infra Rouge (IR)	167
4.- Données de Rotation Spécifique ($[\alpha]_D^{25}$)	167
2. Composé actif de <i>Rumex obtusifolius</i> L (<i>Polygonaceae</i>)	168
<i>A. Composé C6: déméthylmacrosporine I</i>	168
1.- Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	168
2.- Données de Spectrométrie de Masse (SM)	181
3. Composé actif de <i>Gustavia augusta</i> (<i>Lecythidaceae</i>)	185
<i>A. Composé C7: alcool gras</i>	185
1.- Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	185
2.- Données de Spectrométrie de Masse (SM)	185
4. Composés actifs de <i>Bowdichia virgiloides</i> (<i>Leguminosae</i>)	186
1.- Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	186
2.- Données de Spectrométrie de Masse (SM)	191

PARTIE VI. TRAVAUX DE RELATION STRUCTURE-ACTIVITE	193
1. Antécédent	193
2. Triterpènes acides isolés de <i>Brachyotum microdon</i>	194
3. Anthraquinone isolée de <i>Rumex obtusifolius</i>	197
4. Alcaloïdes du type ormosia isolés de <i>Bowdichia virgiloides</i>	199
5. Composés de contrôle	201
 PARTIE VII. CONCLUSIONS	 204
1. Plantes de la Vallée de Zongo en Bolivie	204
A. Collectes et criblage pharmacologique des espèces dans la Vallée de Zongo	204
B. Travaux sur <i>Brachyotum microdon</i> (Melastomataceae)	205
C. Travaux sur <i>Rumex obtusifolius</i> (Polygonaceae)	206
2. Plantes amazoniennes	207
A. Travaux sur <i>Gustavia augusta</i> (Lecythidaceae)	207
B. Travaux sur <i>Bowdichia virgiloides</i> (Leguminosae)	207
3. Relations structure- activité	207

PARTIE VIII. DONNEES EXPERIMENTALES	210
1. Méthodologie de travail dans la zone d'étude	210
<i>A. Zone d'étude : la vallée de Zongo</i>	210
<i>B. Critères de collecte</i>	211
<i>C. Essais biologiques sur Plasmodium falciparum et FBIT</i>	215
1. Test d'inhibition de la biocristallisation de la ferriprotoporphyrine IX (FBIT)	215
2. Test in vitro d'inhibition de la croissance de la phase érythrocytaire de <i>Plasmodium falciparum</i>	217
2. Plantes de la Vallée de Zongo en Bolivie	220
<i>A. Collectes et criblage pharmacologique des espèces dans la Vallée de Zongo</i>	220
3. Extraction et purification des composés obtenus des plantes étudiées	269
<i>A. Travaux sur Brachyotum microdon (Melastomataceae)</i>	269
<i>B. Travaux sur Rumex obtusifolius (Polygonaceae)</i>	276
<i>C. Travaux sur Gustavia augusta (Lecythidaceae)</i>	280
4. Caractéristiques des composés obtenus des plantes étudiées	283

LISTE DES SCHÉMAS

	Page
SCHÉMA # 1.	
Extraction à partir des feuilles de <i>Brachyotum microdon</i>.....	93
SCHÉMA # 2.	
Purification de l'extrait au dichlorométhane des feuilles de <i>Brachyotum microdon</i>.....	94
SCHÉMA # 3.	
Purification du composé actif à partir des feuilles de <i>Rumex obtusifolius</i>.....	101
SCHÉMA # 4.	
Purification de l'extrait au dichlorométhane des graines de <i>Gustavia augusta</i>.....	105

LISTE DES FIGURES

	Page
FIGURE # 1. Le cycle de multiplication de <i>Plasmodium</i> chez ses deux hôtes.....	5
FIGURE # 2. Distribution globale de la maladie avec les zones de résistance.....	6
FIGURE # 3. Alcaloïdes antipaludiques d'origine naturelle.....	13
FIGURE # 4. Quinones antipaludiques d'origine naturelle.....	19
FIGURE # 5. Terpènes antipaludiques d'origine naturelle.....	19
FIGURE # 6. Composés antipaludiques d'origine synthétique.....	29
FIGURE # 7. Localisation des différentes cibles des médicaments dans les érythrocytes infectés par <i>P. falciparum</i>.....	32
FIGURE # 8. Composés actifs sur la vacuole digestive.....	35
FIGURE # 9. Composés actifs au niveau du cytoplasme.....	36
FIGURE # 10. Composés actifs au niveau de l'apicoplaste.....	38
FIGURE # 11. Composés actifs au niveau du mitochondrion.....	40
FIGURE # 12. Composés actifs au niveau la membrane érythrocytaire.....	40
FIGURE # 13. La voie catabolique de la dégradation de l'hémoglobine à l'intérieur de la vacuole digestive du parasite.....	42
FIGURE # 14. Structures de l'hémozoïne. a) Modèle dérivé des études spectroscopiques. b) Modèle dérivé des études de diffraction de Rayon- X. c) Modèle actuel dérivé des études de Rayon- X.....	45
FIGURE # 15. Composés qui inhibent la formation de l'hémozoïne.....	53
FIGURE # 16. Porphyrines et métaloporphyrines présentant des activités antipaludiques.....	56
FIGURE # 17. Carte de distribution et d'amplitude du paludisme en Bolivie	60

	Page
FIGURE # 18. Collectes dans la Vallée de Zongo.....	71
FIGURE # 19. Photographie de <i>Brachyotum microdon</i> collecté dans la Vallée de Zongo.....	90
FIGURE # 20. <i>Rumex obtusifolius</i> collectée dans la vallée du Zongo..	99
FIGURE #21. Molécules isolées des familles les plus prometteuses contre la malaria en Amazonie.....	103
FIGURE # 22.- Alcaloïdes isolés de <i>Bowdichia virgilioides</i>.....	107
FIGURE # 23. Fragments obtenus moyennant l'analyse des spectres de HMBC et COSY de C2.....	117
FIGURE # 24. Fragments observés en EI de C2.....	120
FIGURE # 25. Corrélations représentatives du composé C3 (HMBC, COSY).....	130
FIGURE # 26. Représentation des différentes structures tridimensionnelles de C3.....	131
FIGURE # 27. Fragments observés en ionisation de C3.....	135
FIGURE # 28. Représentation des corrélations représentatives en HMBC et COSY de C4.....	146
FIGURE # 29. Possible représentation tridimensionnelle de C4.....	148
FIGURE # 30. Représentation des différentes structures tridimensionnelles de C4.....	150
FIGURE # 31. Représentation des corrélations de C5 : (A) corrélations en HMBC à partir des méthyles. (B) corrélations représentatives en HMBC et COSY.....	162
FIGURE # 32. Représentation des différentes structures tridimensionnelles de C5.....	164
FIGURE # 33. Corrélations HMBC existantes sur le cycle aromatique A de C6.....	173
FIGURE # 34. Corrélations HMBC existantes sur le cycle aromatique B de C6.....	173
FIGURE # 35. Anthraquinone correspondant à C6.....	174
FIGURE # 36. Formes isomériques de l'anthraquinone correspondant à C6.....	175

	Page
FIGURE # 37. Possible biosynthèse de l'isomère 1 de C6.....	176
FIGURE # 38. Biosynthèse possible de l'isomère 2 de C6.....	178
FIGURE # 39. Structure du composé C6, Déméthylmacrosporine I...	181
FIGURE # 40. Fragmentations de décarboxylation en C6.....	182
FIGURE # 41. Fragmentations proposées à partir de C6.....	183
FIGURE # 42. Fragmentations proposées à partir de C6 décarbonylé.....	183
FIGURE # 43. Structures tridimensionnelles de C8 (A) et C9 (B).....	191
FIGURE # 44. a) Stabilisation du chlorure d'hémine par l'acide corosolique. b) Formation du complexe d'hémine -acide corosolique..	196
FIGURE # 45. a) Stabilisation du chlorure d'hémine par la déméthylmacrosporine I. b) Formation du complexe d'hémine- déméthylmacrosporine I.....	198
FIGURE # 46. a) Stabilisation du chlorure d'hémine par l'homoomosanine. b) Formation du complexe d'hémine- homoomosanine.....	200
FIGURE # 47. a) Stabilisation du chlorure d'hémine par la chloroquine. b) Formation du complexe d'hémine- chloroquine.....	202
FIGURE # 48. a) Stabilisation du chlorure d'hémine par quinine. b) Formation du complexe d'hémine- quinine.....	203
FIGURE # 49. Critère chimio-taxonomique. Exemples de familles et espèces actives contre le paludisme en Amérique.....	211
FIGURE # 50. Composés antipaludiques isolés d'espèces américaines.....	212
FIGURE # 51. Critère Organoleptique. Exemples d'espèces colorées présentes dans la Vallée de Zongo.....	213
FIGURE # 52. Critère de parcelles altitudinales. Exemples d'espèces trouvées dans les étages altitudinaux de la Vallée de Zongo.....	214
FIGURE # 53. Comparaison entre les essais FBIT et <i>Plasmodium falciparum</i>	219

LISTE DES TABLEAUX

	Page
TABLEAU # 1. Facteurs qui contribuent à l'accroissement du paludisme dans le monde.....	7
TABLEAU # 2. Alcaloïdes antipaludiques d'origine naturelle.....	15
TABLEAU # 3. Quinones antipaludiques d'origine naturelle.....	21
TABLEAU # 4. Terpènes antipaludiques d'origine naturelle.....	23
TABLEAU # 5. Quassinoides, coumarines, lignanes et divers antipaludiques d'origine naturelle.....	25
TABLEAU # 6. Nombre de cas de paludisme (<i>Plasmodium vivax</i>) par départements en Bolivie.....	61
TABLEAU # 7. Espèces boliviennes actives contre <i>Plasmodium in vitro</i> et <i>in vivo</i>.....	64
TABLEAU # 8. Résultats biologiques d'espèces actives dans le test HPIA provenant de la pharmacopée Tacana.....	69
TABLEAU # 9. Collectes dans la Vallée de Zongo.....	72
TABLEAU #10. Résultats des activités des extraits de plantes du Zongo sur FBIT et <i>Plasmodium falciparum</i>.....	78
TABLEAU #11. Comparaison des résultats obtenus sur le test FBIT et <i>P. falciparum</i> des espèces collectées durant différentes périodes....	86
TABLEAU #12. Comparaison des activités des principaux extraits sur FBIT et contre <i>P. falciparum</i>.....	87
Tableau #13. Résultats de l'activité des organes de <i>Brachyotum microdon</i> sur le test FBIT et sur <i>Plasmodium falciparum</i>	91
TABLEAU # 14. Résultats des tests FBIT obtenus sur les extraits provenant de <i>Gustavia augusta</i>.....	104
TABLEAU # 15. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC en C2 (400 MHz, CDCl₃).....	113
TABLEAU # 16. Corrélations hétéronucléaires provenant d'HMBC du composé C2 (400 MHz, CDCl₃).....	114

	Page
TABLEAU # 17. Corrélations homonucléaires provenant du spectre COSY du composé C2 (400 MHz, CDCl₃).....	115
TABLEAU # 18. Comparaison de données de ¹H-RMN et ¹³C-RMN du composé C2 et celles reportées pour le β-sitostérol.....	118
TABLEAU # 19. Assignment des carbones et protons de C3 à l'aide du spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃).....	123
TABLEAU # 20. Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre HMBC de C3 (500 MHz, CDCl₃).....	125
TABLEAU # 21. Corrélations homonucléaires provenant du spectre COSY de C3 (500 MHz, CDCl₃).....	127
TABLEAU # 22. Comparaison des données expérimentales de ¹³C-RMN de C3 et de l'oléanolate de méthyle.....	132
TABLEAU # 23. Assignations des carbones et des protons à partir des données du spectre HSQC de C4 (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).....	139
TABLEAU # 24. Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre HMBC de C4 (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).....	141
TABLEAU # 25. Corrélations homonucléaires provenant du spectre COSY de C4.....	143
TABLEAU # 26. Comparaison des données expérimentales du ¹³C-RMN de C4 et celles de l'acide ursolique obtenues de la littérature	149
TABLEAU # 27. Assignations des carbones et des protons de C5a moyennant le spectre HSQC (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).....	155
TABLEAU # 28 Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre HMBC de C5a (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).....	157
TABLEAU # 29. Corrélations homonucléaires provenant du COSY de C5.....	159
TABLEAU # 30. Comparaison de données de ¹³C-RMN de C5a et du corosmate de méthyle (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).....	165
TABLEAU # 31. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC en C6 (400 MHz, CD₃OD-CDCl₃).....	170
TABLEAU # 32. Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre HMBC de C6 (400 MHz, CD₃OD-CDCl₃).....	171

TABLEAU # 33. Comparaison des déplacements chimiques en ¹ H-RMN des anthraquinones séparées de <i>Rumex obtusifolius</i> et de <i>Dichotomophthora lutea</i> (250 MHz, DMSO).....	180
TABLEAU # 34. Données de ¹³ C-RMN de C8, C9, Homoormosanine et Ormosanine.....	188
TABLEAU # 35. Corrélations des protons et carbones de C8 et C9 moyennant HSQC.....	189
TABLEAU # 36. Données d'EI de C8, C9, Homoormosanine et Ormosanine.....	192
TABLEAU #37. Résultats des tests FBIT et sur <i>Plasmodium falciparum</i> des triterpènes acides séparés de <i>Brachyotum microdon</i>	194
TABLEAU #38. Résultats du test FBIT d'extraits de <i>Brachyotum microdon</i>	269
TABLEAU #39. Fractions provenant de la séparation par VLC de <i>Brachyotum microdon</i>	269
TABLEAU # 40. Résultats du test FBIT des fractions provenant de la séparation par VLC de <i>Brachyotum microdon</i>	270
TABLEAU # 41. Fractions provenant de la séparation par chromatographie FLASH de la fraction U.....	271
TABLEAU # 42. Résumé de la purification de BMII-14F3.....	271
TABLEAU #43. Bilan de la purification de BMII-14F7.....	272
TABLEAU # 44. Résumé de la purification de BMII-14F9 par chromatographie d'exclusion moléculaire sur LH-20.....	272
TABLEAU #45. Résumé de la purification de BMII-43L3 moyennant une CCM préparative ou PCCM.....	273
TABLEAU #46. Résumé de la purification de BMI-43V10 (FLASH 34 g SiO ₂).....	274
TABLEAU #47. Résumé de la purification de BMI-43V10 (FLASH 73 g SiO ₂).....	274
TABLEAU # 48. Résumé de la purification de BMC-32U moyennant la chromatographie de type FLASH.....	275

TABLEAU # 49. Résumé des fractions provenant de la purification en HPLC [MeOH-H₂O:TFA 0.1 % (80:20)] de BMC-32F5.....	275
TABLEAU # 50. Suite. Fractions provenant de la séparation par VLC de <i>Rumex obtusifolius</i>.....	276
TABLEAU # 51. Résultats de FBIT des fractions provenant de la séparation par VLC de <i>Rumex obtusifolius</i>.....	278
TABLEAU # 52. Fractions provenant de la séparation par chromatographie avec la colonne ouverte de RO-21U1.....	279
TABLEAU # 53. Résultats du test FBIT des fractions provenant de la séparation par chromatographie avec la colonne ouverte de RO-21U1.....	279
TABLEAU # 54. Résultats du test FBIT des cristaux RO-8Vc (C6)....	279
TABLEAU # 55. Fractions provenant de la séparation par VLC de <i>Gustavia augusta</i>.....	280
TABLEAU # 56. Résultats de FBIT des fractions provenant de la séparation par VLC de <i>Gustavia augusta</i>.....	281
TABLEAU # 57. Fractions provenant de la purification par chromatographie FLASH de la fraction GGC-19V3.....	281
TABLEAU # 58. Résultats des tests FBIT des fractions provenant de la chromatographie Flash de la fraction GGC- 19V3....	282

PARTIE I

LE PALUDISME

1.Introduction

"Reine des fièvres", "Fièvre romaine", "Mal'aria" "Fièvre des marais" sont des dénominations pour le paludisme ou malaria dans l'ancien monde. Dans l'empire égyptien, les papyrus (1570 A. C.) mentionnent "une fièvre" et une variété de médicament pour la soulager. Dans la période Védique (1500- 800 A.C.), on trouve aussi des écrits qui parlent des fièvres appelées "reine des fièvres". Dans l'ancienne médecine chinoise, Nei Ching, les symptômes de la fièvre sont attribués aux démons chinois. Vers le 6^{ème} siècle A.C. en Grèce, des poètes comme Homère et Sophocle, des philosophes comme Platon et Aristote et des comédiens comme Aristophane ont mentionné dans leurs créations des "fièvres clignotantes". Dans la Rome Ancienne, il avait des temples consacrés à la déesse Febris qui était la représentation physique de la maladie appelée "fièvre romaine". Dans cette même région, cette maladie sera connue ensuite comme Mal'aria qui signifie mauvais air. Dans le nouveau monde (1630), cette maladie est appelée "fièvre des marais "[1]. (Sherman, 1998).

Cette thèse se divise en six parties. **La Partie I** est composée de deux chapitres: le premier chapitre illustre l'histoire de la représentation de la maladie à travers les différentes dénominations que prend cette maladie dans les époques "préscientifiques", le deuxième chapitre présente la biologie et la prévalence du paludisme, suivi par un bilan historique des composés utilisés en thérapeutique antipaludique. Finalement, nous avons introduit les différentes cibles pharmacologiques qui contribuent à la découverte de nouveaux antipaludiques. **La Partie II**, appelée "à la recherche d'inhibiteurs de la métabolisation de l'hémoglobine

en Bolivie”, se divise en 2 chapitres. Le premier chapitre, présente la formation par le parasite du pigment malarique ou hémozoïne à partir de l’hémoglobine, les propriétés du pigment malarique et l’inhibition de sa formation. Dans ce chapitre sont également présentés les différents inhibiteurs et leurs mécanismes d’action possibles. Dans le chapitre deux, nous décrivons les caractéristiques géographiques et climatiques de la Bolivie ainsi que la situation épidémiologique du paludisme dans le pays. Pour placer ce travail dans le contexte d’autres travaux effectués en Bolivie et ailleurs, une présentation générale des inhibiteurs de la schizogonie érythrocytaire de *Plasmodium* et de la biocristallisation de la ferriprotoporphyrine (FPIX) est proposée. **La Partie III** présente les résultats du travail expérimental fait dans la vallée de Zongo et recense les plantes étudiées. Dans le 1^{er} chapitre, nous listons les plantes collectées en fonctions des 3 critères de collecte retenus. Ensuite dans le chapitre deux, les résultats pharmacologiques obtenus sur les plantes collectées sont présentés. Dans les chapitres trois et quatre, nous décrivons la séparation et l’identification des inhibiteurs de FPIX dans *Brachyotum microdon* et *Rumex obtusifolius*. **La Partie IV** contient des travaux additionnels de composés antipaludiques isolés de deux espèces amazoniennes médicinales: *Bowdichia virgiloides* et *Gustavia augusta*. **La Partie V** présente la détermination de structures des composés actifs, isolées des plantes étudiées *Brachyotum microdon*, *Rumex obtusifolius*, *Gustavia augusta* et *Bowdichia virgiloides*. Dans la **Partie VI**, une hypothèse de relation structure-activité est discutée pour chaque composé actif isolé. **La Partie VII** renferme les conclusions et les perspectives de ce travail de thèse. **La Partie VIII** est divisée en 3 chapitres, qui contiennent les données expérimentales de la méthodologie de travail, des collectes, de la purification et de la caractérisation des composés.

2. Antécédents

A. Biologie du paludisme

Le paludisme ou malaria est une maladie parasitaire, transmise par le parasite du genre *Plasmodium*. Les malades présentent une température élevée et constante. En fonction du type de parasite, cette maladie peut être mortelle. Il y a quatre espèces de *Plasmodium* chez l'être humain. Ces espèces sont *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium malariae*. Des quatre espèces de *Plasmodium*, *P. falciparum* donne les formes les plus sévères de la maladie, il est également responsable de la mortalité.

Le parasite a deux types de multiplications, sexuée et asexuée. La multiplication sexuée se fait dans le moustique ou hôte définitif et la multiplication asexuée se fait dans l'hôte intermédiaire, l'être humain. Dans la multiplication sexuée, chaque moustique produit 1'ookinète qui donnera environ 10 000 sporozoïtes. Quand le moustique se nourrit du sang d'une personne saine, il lui transmet le parasite par l'inoculation de sa salive.

Dans le tube digestif du moustique, le gamétocyte masculin ou, microgamétocyte produit de nombreux microgamètes flagellés qui une fois libérés (exaflagellation) se dirigent vers le gamète femelle ou macrogamète mûr. La fécondation du gamète femelle par le gamète masculin a lieu dans l'estomac du moustique avec formation d'un œuf qui s'allonge et dont la mobilité (ookinète) lui permet de se mouvoir jusqu'à la paroi de l'estomac. Il adhère à la paroi externe de l'estomac et se convertit en oocyste. Le développement de cet oocyste conduit la reproduction asexuée de nombreux sporozoïtes. Les sporozoïtes libérés se concentrent ensuite dans les glandes salivaires du moustique.

Dans l'être humain commence la deuxième multiplication qui comprend deux étapes. La première étape appelée schizogonie exo-érythrocytaire se développe à l'intérieur du foie. Ici, chaque sporozoïte transmis par le moustique donnera environ 10 000 à 30 000 mérozoïtes. Ces mérozoïtes sont libérés dans le sang où la deuxième étape de multiplication appelée schizogonie érythrocytaire commence. Cette deuxième étape est importante en chimiothérapie parce que la plupart des composés utilisés contre la malaria agissent sur cette partie du cycle (schizonticides érythrocytaires). Dans l'étape de schizogonie érythrocytaire, chaque mérozoïte donnera environ 8 à 32 nouveaux mérozoïtes. La Figure # 1 présente le cycle de multiplication de *Plasmodium* chez ses deux hôtes [Deharo et al., 2000].

Dans le foie, les sporozoïtes se développent dans les hépatocytes. Il peut exister à ce moment-là une étape de latence. Une nouvelle multiplication asexuée conduit à la production de milliers de mérozoïtes qui seront libérés dans la circulation sanguine.

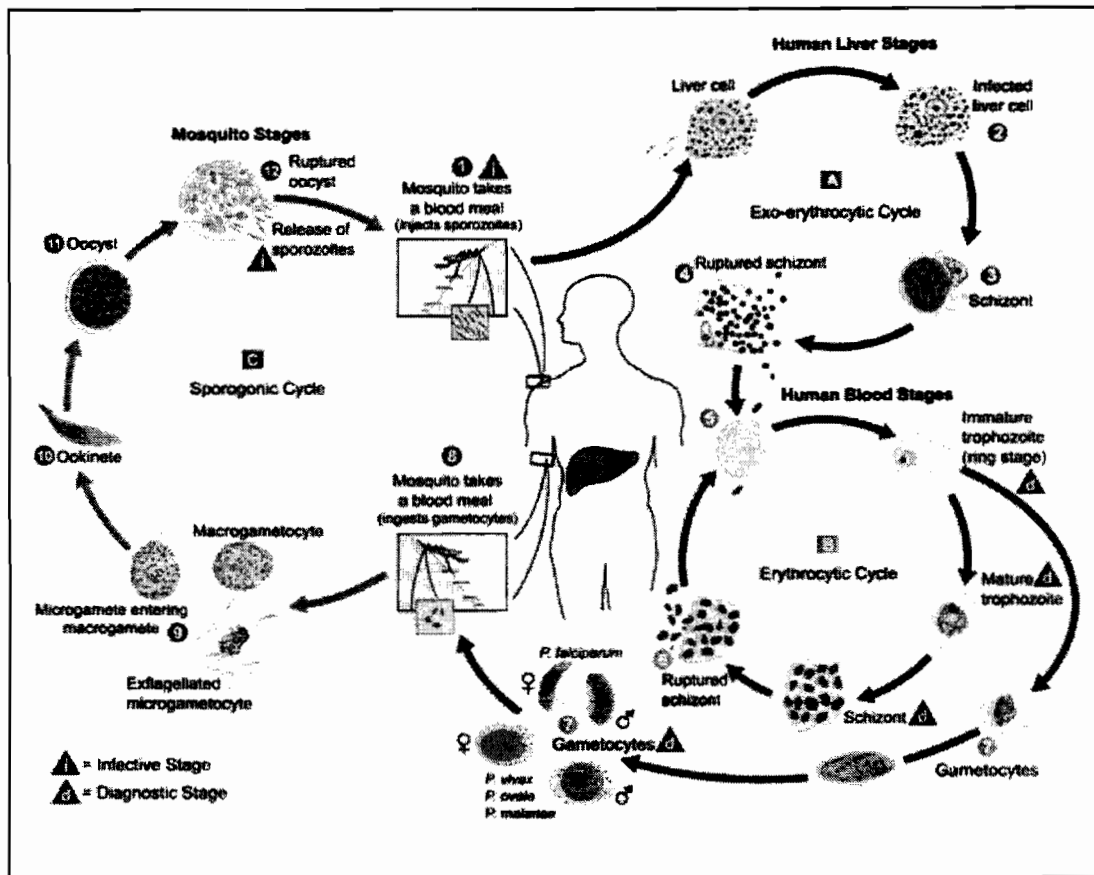


FIGURE # 1. Le cycle de multiplication de *Plasmodium* chez ses deux hôtes.

B.Prévalence du paludisme

Il y a 40 ans seulement 10% de la population du monde était en situation d'être infecté par le paludisme. De nos jours, à cause de l'augmentation de la résistance des parasites et des moustiques, plus de 40% de la population mondiale est en danger. La maladie, endémique dans plus de cent pays, infecte 300 - 500 millions de personnes et en tue 3 millions chaque année. La plus grande partie des victimes, soit 2 millions sont des enfants.

La Malaria a été éliminée de l'Amérique du Nord et d'une grande partie de l'Europe pendant la première moitié du vingtième siècle. L'éradication a été obtenue grâce à l'assèchement des marais, la chimioprophylaxie massive et le contrôle des

vecteurs grâce à des insecticides puissants et peu coûteux comme le DDT. Ensuite, l'intérêt pour lutter contre le paludisme a décliné durant 25 ans. L'industrie et la recherche ont arrêté les travaux pour développer insecticides et nouveaux médicaments. Seulement 3 des 1223 nouveaux médicaments développés entre 1975 et 1996 sont des antipaludiques [Greenwood et al., 2002]. Aujourd'hui, la région plus dramatiquement touchée à cause de cet abandon est l'Afrique où la présence d'un excellent vecteur *Anophèles gambiae* et les problèmes sociaux et économiques ont relancé l'épidémie. Par exemple, le degré d'inoculation (fréquence avec laquelle un individu est piqué par un moustique infecté durant une année) en Asie ou Amérique du Sud est à un maximum de 5 tandis qu'en Afrique sub-saharienne il peut être de 1000! [Greenwood et al., 2002]. Le Tableau # 1 présente un bilan des facteurs qui ont contribué à l'accroissement du paludisme dans le monde et la Figure # 2 présente la distribution globale de la maladie avec les zones de résistance aux médicaments utilisés.

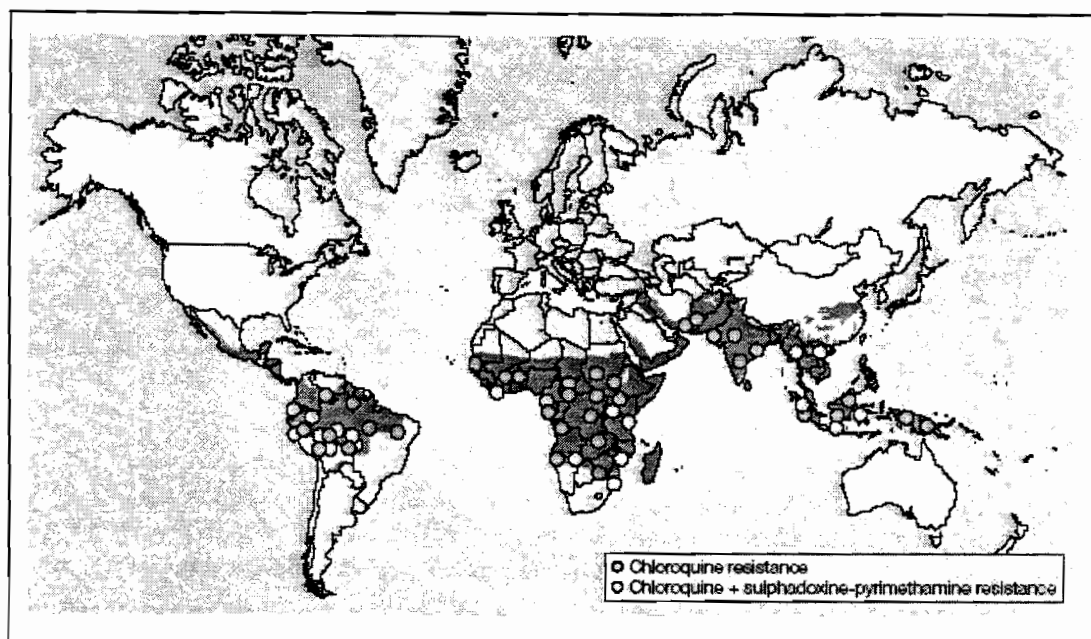


FIGURE # 2. Distribution globale de la maladie avec les zones de résistance.

FACTEURS	LOCALISATION GEOGRAPHIQUE	PARAMETRES	CAUSES	CONSEQUENCES
Résistance aux médicaments	1.- Sud-est Asie 2.- Afrique	1.- <i>P. falciparum</i> souches chloroquino résistantes. 2.- Résistance à la chloroquine et à la sulphadoxine – pyriméthamine .	Composés utilisés en prophylaxie. Composés avec une longue vie moyenne dans le plasma.	Accroissement des cas de paludisme résistants au Sud-Est Asiatique et en Afrique avec la conséquence d'un désastre médical.
Résistance aux insecticides	Est et Ouest de l'Afrique tropicale	Résistance aux insecticides du type pyréthrénoïde.		Programmes de lutte insecticides menacés en particulier l'efficacité des moustiquaires imprégnées
Guerre et cataclysmes	Afrique, et autres	Malaria chez les réfugiés	Délabrement des services de santé	Accroissement des cas de paludisme
Voyages	Voyageurs provenant de zones libres de paludisme	~ 7000 cas de paludisme importés en France par an	Voyages de zones libres de paludisme à des zones endémiques	Augmentation des cas sévères de paludisme en zones libres de cette maladie
Augmentation de la population	1.- Afrique 2.- Autres zones endémiques	Le nombre de malades dans ces régions a doublé	Politique inefficace de contrôle des naissances	Apparition de nouveaux cas

TABLEAU # 1. Facteurs qui contribuent à l'accroissement du paludisme dans le monde.

FACTEURS	LOCALIZATION GEOGRAPHIQUE	PARAMETRES	CAUSES	CONSEQUENCES
Changements climatiques	1.- Montagnes en Asie, Afrique et Amérique du Sud 2.- Afrique	Propagation du paludisme dans des lieux où il n'existait pas.	1.- Réchauffement global 2.- Inondations produisent par les pluies du "El Niño"	Accroissement des cas de paludisme
Changements de l'environnement	1.- Thaïlande 2.- Éthiopie 3.- Outres	1.- Vecteurs de la malaria s'établissent dans les plantations d'hévéa. 2.- Vecteurs trouvés dans de petits barrages. 3.- Changements de pratiques agricoles (irrigation et déforestation)	Changements des écosystèmes	Augmentation du nombre de cas

TABLEAU # 1. Suite. Facteurs qui contribuent à l'accroissement du paludisme dans le monde.

C. Rappel historique sur la genèse des produits naturels antipaludiques

Les premières observations en relation avec la malaria viennent d'ancienne Egypte et d'Inde. Dans certains écrits est reporté le grossissement de la rate dû au paludisme et l'utilisation de certains remèdes curatifs [Sherman, 1998]. Cependant, les premières tentatives de traitement efficace de la malaria, reportées par les historiens européens ont eu lieu au XVI^e siècle, époque où les indigènes péruviens utilisent l'écorce de quina-quina (*Cinchona* spp). Ce traitement sera immédiatement exporté à travers toute l'Europe. Deux cents ans après, en 1820, la quinine (1) a été isolée comme le principal composant actif des quinquinas et elle a commencé à être utilisée à la place de l'extrait végétal [Egan, 2001]. Cet alcaloïde continue à être un médicament de choix pour le traitement du paludisme sévère et compliqué. Parmi les effets secondaires que la quinine produit, il y a le cinchonisme (un effet caractérisé par la perte d'audition, des diarrhées, de la nausée, des troubles de la vision...). Après la découverte de la quinine, plusieurs plantes ont été étudiées et un grand nombre de composés ont été isolés. Ces composés peuvent être classés en 5 familles structurales; les alcaloïdes, les terpènes, les quinones, les coumarines et un petit groupe de molécules qui proviennent d'autres voies biosynthétiques.

Parmi les alcaloïdes isolés, nous pouvons mentionner les isoquinoléines, les indoles et les aporphines comme les groupes actifs les plus importants. Certains de ces alcaloïdes sont considérés comme d'importantes alternatives pour la découverte de nouveaux traitements antipaludiques.

De *Hernandia voyronii* Jumelle (*Hernandiaceae*), la (S)- réticuline (2), la laudanosine (3) et les hervélines A à D (4- 7) ont été isolées. La benzyltétrahydro

isoquinoléine la plus active est l'hervéline A (4) (CI_{50} = 1.68 μ M contre une souche résistante de *P. falciparum*) suivi par la (S)- réticuline (2) (CI_{50} = 16 μ M). La laudanosine (3) (CI_{50} = 27 μ M contre une souche de *P. falciparum* résistante) a présenté 32 % de suppression de la parasitémie de *P. berghei in vivo* [Rasoanaivo et al., 1998]. Des familles végétales *Ancistrocladaceae* et *Dioncophyllaceae*, des naphtyl isoquinoléines très actives ont été purifiées. Les Dioncophyllines A (8), B (9) et C (10) ont été obtenues d'*Ancistrocladus abbreviatus*, *A. barteri* Scott- Elliot et *Triphyophyllum peltatum* (Hutch. Et Dollz). La Dioncophylline A (8) a donné les plus importantes CI_{50} *in vitro* contre des souches chloroquinosensibles de *P. falciparum* et contre *P. berghei*, 21 ng/ml et 38 ng/ml, respectivement [François et al., 1995]. La dioncophylline C (10) isolée de *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) a présenté le plus important résultat *in vivo* avec une inhibition totale de la parasitémie de *P. berghei* chez la souris [François et al., 1997]. Ces composés représentent des candidats prometteurs pour de futurs développements.

Des alcaloïdes du type indolique, avec de bonnes activités *in vitro*, ont été isolés des familles des *Loganiaceae*, *Asclepiadaceae* et *Apocynaceae*. L'icajine (11) (*Strychnos henningsii* Gils., *Loganiaceae*) n'a pas présenté une activité significative contre une souche chloroquino sensible de *P. falciparum*; il a cependant donné une CI_{50} = 95 μ M contre la souche résistante. De plus, l'icajine (11) a un effet synergique avec la méfloquine (36) quand il est testé contre une souche de *P. falciparum* méfloquino résistante. Cet indole n'est pas cytotoxique (HCT-116, ligne cellulaire de cancer humain) [Frédérich, et al., 2001]. Un autre composé isolée de *Strychnos icaja* Baill. (*Loganiaceae*) est la strychnobrasiline (12) avec une CI_{50} = 80 μ M contre une souche chloroquino résistante de *P. falciparum*. La voacamine (13), un bis indole, isolée d'espèces de *Voacana* et de *Peschiera fuchsiaefolia* (D. C.) Miers (*Apocynaceae*) a

donné d'importants résultats contre des souches chloroquino sensible et résistante de *P. falciparum* avec des CI_{50} respectivement de 238 ng/ml et 290 ng/ml. Essayée contre *P. berghei in vivo*, la voacamine (13) inhibe 43% de la croissance des parasites à 10 mg/kg. Finalement, ce bis indole est actif contre les tumeurs de la souris à P-388 et il est cytotoxique sur les lignées cellulaires KB. Il a toutefois un bon index de sélectivité en ce qui concerne son activité antiplasmodiale [Federici et al., 2000; Ramanifrahasimbola et al., 2001]. Un autre alcaloïde peut retenir l'intérêt pour des études complémentaires, il s'agit de la cryptolepine (14). Cet alcaloïde indoloquinoléique a présenté les résultats suivants *in vitro*: 0.059 μ M contre une souche chloroquino sensible de *P. falciparum* et 0.23 μ M contre une souche chloroquino résistante de *P. falciparum* et 45 % d'inhibition contre *P. berghei*. La cryptolepine (14) s'intercale avec l'ADN et présente également une activité antitumorale. Sa structure est actuellement étudiée pour la modélisation de nouveaux médicaments contre le paludisme et le cancer [Paulo et al., 2000; Cimanga et al., 1997].

Parmi les alcaloïdes aporphiniques, on remarque les composés isolés de *Hernandiaceae* et *Annonaceae*. La (-) roemrefidine (15) (*Sparattanthelium amazonum* Mart., *Hernandiaceae*) présente des résultats biologiques intéressants. Contre des souches chloroquino sensible et résistante de *P. falciparum*, elle donne des CI_{50} de respectivement 0.71 μ g/ml et 0.58 μ g/ml. Contre *P. berghei*, elle présente une DE_{50} = 0.98 mg/Kg/4jours. De plus, elle n'est pas cytotoxique contre trois lignes cellulaires (KB, Hep-2 et HeLa) [Muñoz et al., 1999]. L'hadranthine A (16), la sampangine (17) et la 3- méthoxy- sampangine (18), composés obtenus de *Duguetia hadrantha* (Diels.) R. E. Fries. (*Annonaceae*), ont de très intéressantes propriétés biologiques. L'alcaloïde azaaporphinique le plus actif contre une souche chloroquino sensible de *P. falciparum* est l'hadranthine A (16) (CI_{50} = 120 ng/ml) alors que la sampangine (17) donne le

meilleur résultat contre une souche chloroquino résistante de *P. falciparum* (CI_{50} = 68 ng/ml) suivi par la 3- méthoxy- sampangine (18) (CI_{50} = 95 ng/ml). Ces alcaloïdes sont plus actifs que la chloroquine (33) contre une souche de *P. falciparum* résistante (Clone W2), ils méritent donc des recherches complémentaires [Muhammad et al., 2001]. Les structures de tous les alcaloïdes indiquent précédemment sont présentées dans la Figure # 3 et le Tableau # 2 présente un bilan de leurs activités.

Parmi les quinones actives, on mentionne trois composés importants. La plumbagine (19), isolée de *Nepenthes thorelii* Lecomte (*Nepenthaceae*), avec une CI_{50} = 0.27 μ M contre une souche chloroquino sensible de *P. falciparum*. Cette naphtoquinone est un analogue de l'ubiquinone et elle inhibe fortement la NADH déshydrogénase [Likhitwitayawuid et al., 1998a]. Le deuxième composé est la knipholone anthrone (20) (*Kniphonia foliosa* Hochst., *Asphodelaceae*) avec des CI_{50} = 0.42 μ M et CI_{50} = 0.38 μ M contre des souches chloroquino sensible et résistante de *P. falciparum* [Bringmann et al., 1999]. Finalement, l'activité antiplasmodiale de la 5-hydroxy- 2- (1'-hydroxy)-éthyle- naphtho- [2, 3b]- furan- 4, 9- dione (21) a été mise en évidence avec des CI_{50} respectives contre les souches sensible et résistante de 0.67 μ M et 0.17 μ M [Perez et al., 97]. La Figure # 4 présente les structures des quinones mentionnées et le Tableau # 3 présente un bilan de leurs activités.

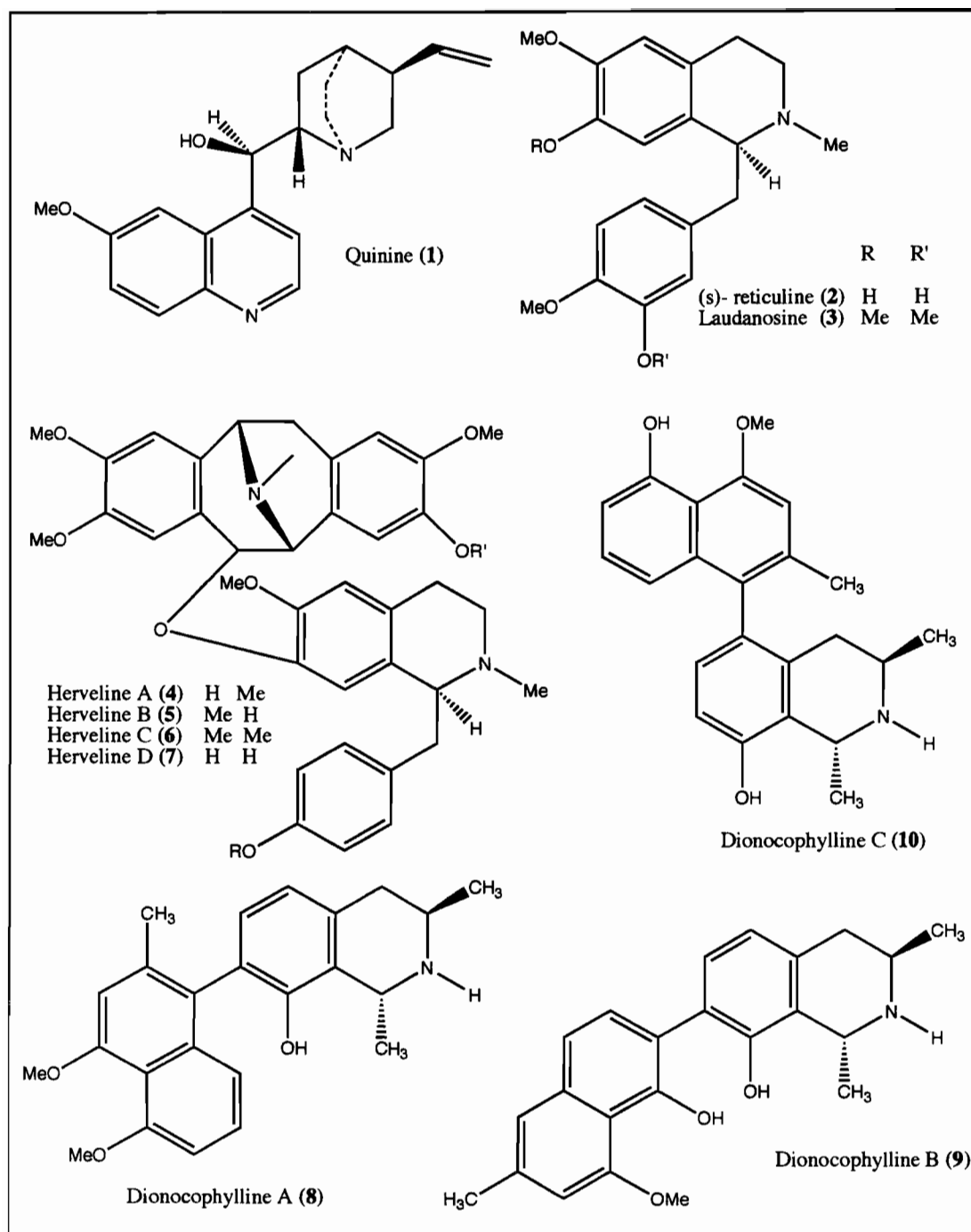


FIGURE # 3. Alcaloïdes antipaludiques d'origine naturelle.

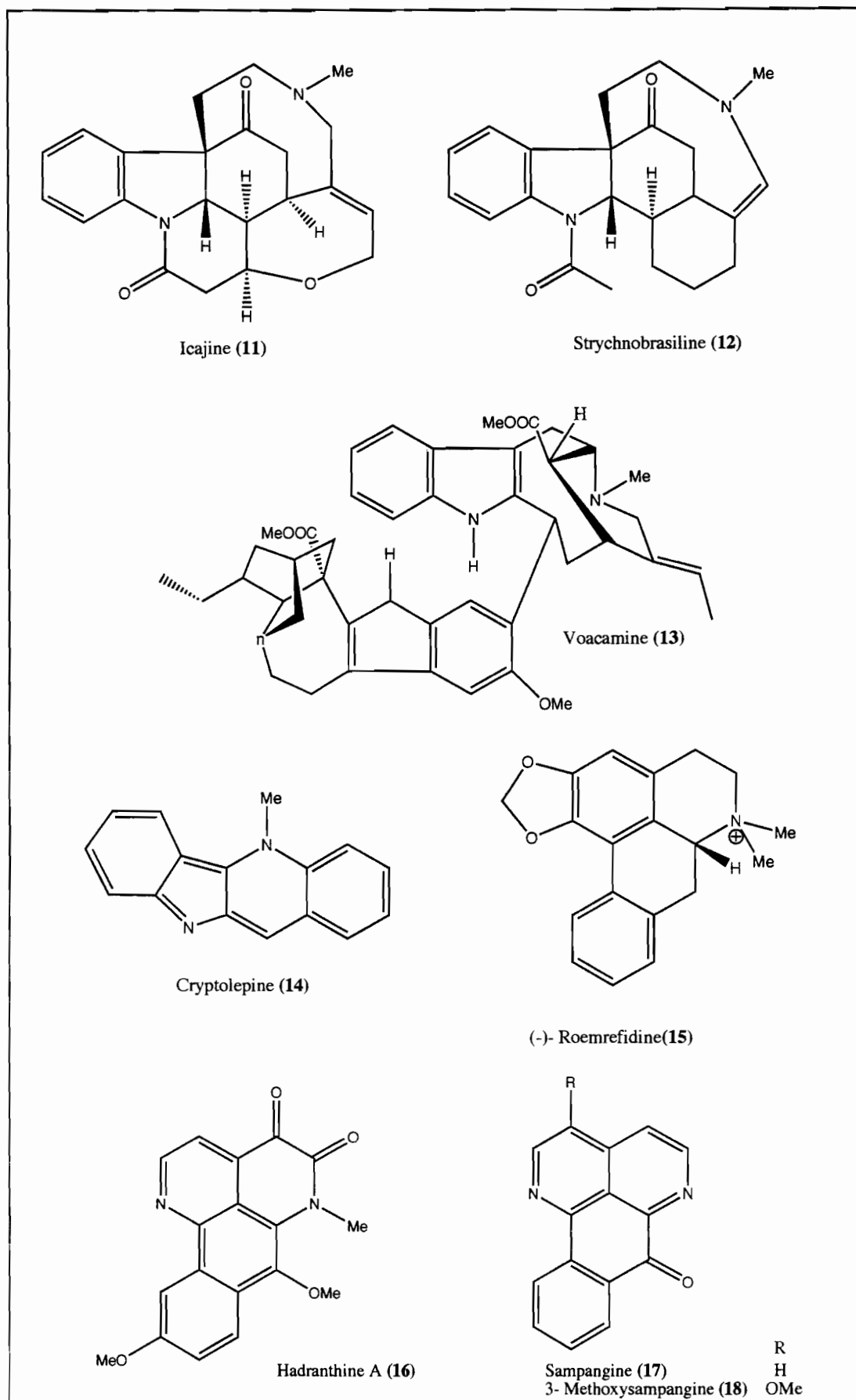


FIGURE # 3. Suite. Alcaloïdes antipaludiques d'origine naturelle.

COMPOSÉ	FAMILLE	<i>P. falciparum</i> , souche chloroquino – sensible, CI ₅₀	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- résistante, CI ₅₀	<i>P. berghei</i> , DE ₅₀ ou % suppression parasitémie	REFERENCES
Cryptolépine	Asclepiadaceae	0.059 μM^1	0.23 μM^2	45.4 %	[Paulo et. al., 00; Cimanga et.al.97]
Isocryptolépine	Asclepiadaceae	-	0.3 μM^3		[Grellier et. al., 96]
Cryptoheptine	Asclepiadaceae	1.18 μM^1	0.801 μM^2		[Paulo et. al., 00]
Cryptoheptine HCl	Asclepiadaceae	41 ng/ml ⁵	62 ng/ml ² ; 52 ng/ml ⁴	10.8% ⁶ , 15.6%	[Cimanga et.al.97]
11-Hydroxy- cryptolepine	Asclepiadaceae	31 ng/ml ⁵	45 ng/ml ² ; 59 ng/ml ⁴	43.2%	[Cimanga et.al.97]
Quindoline	Asclepiadaceae	63 ng/ml ⁵	87 ng/ml ² ; 108 ng/ml ⁴	42.1% ⁶ , 48.2%	[Cimanga et.al.97]
Neocryptolépine	Asclepiadaceae	35 ng/ml ⁵	51 ng/ml ² ; 65 ng/ml ⁴		[Cimanga et.al.97]
Ethyl cryptolépinoate	Asclepiadaceae		3.7 μM^2		[Paulo et. al., 00]
Hydroxycryptolépine	Asclepiadaceae	77 μM^1	102 μM^2		[Paulo et. al., 00]
Cryptoquindoline	Asclepiadaceae	9 μM^1	34 μM^2		[Paulo et. al., 00]
9- Aminoacridine	Asclepiadaceae		44.7 μM^2		[Kirby et. al., 95]
Icajine	Loganiaceae	-	95 μM^4		[Frédérich et. al., 01]
Isorétuline	Loganiaceae	-	183 μM^4		[Frédérich et. al., 01]
Strychnobrasiline	Loganiaceae	-	80 μM^4		[Frédérich et. al., 01]
Rétuline	Loganiaceae		180 μM^4		[Frédérich et. al., 01]
Dolichantoside	Loganiaceae		12.8 μM^4		[Frédérich et. al., 01]
Holstiine	Loganiaceae		34 μM^4		[Frédérich et. al., 01]

Souches: ¹: T 996
⁷: NK 65
¹³: ANKA en OF1 souris

²: K1
⁸: INDO
¹⁴: 2087

³: FcB1
⁹: NF54
¹⁵: *P. vinckei petteri* 279BY

⁴: W2
¹⁰: ANKA

⁵: D6
⁶: *P. berghei yoelii* N67

¹¹: FCR-3

¹²: FCM29/Cameroon
¹⁷: Dd2

¹⁶: 3D7

TABLEAU # 2. Alcaloïdes antipaludiques d'origine naturelle.

COMPOSÉ	FAMILLE	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- sensible, CI ₅₀	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- résistante, CI ₅	<i>P. berghei</i> , DE ₅₀ ou % suppression parasitémie	REFERENCES
Voacamine	Apocynaceae	238 ng/ml ⁵	290 ng/ml ⁴	43 % (dose 10 mg/Kg) ⁶	[Federici et. al., 00; Ramanifrahasimbola et. al., 01]
Vobassine	Apocynaceae	471 ng/ml ⁵	816 ng/ml ⁴	43 % (dose 10 mg/Kg) ⁶	[Federici et. al., 00]
Coronaridine	Apocynaceae	498 ng/ml ⁵	276 ng/ml ⁴		[Federici et. al., 00]
Pléiomutinine	Apocynaceae		5.2 μ M ²	- ¹⁰	[Addae-Kyereme et. al., 01]
Pléiocarpamine	Apocynaceae		17.6 μ M ²	- ¹⁰	[Addae-Kyereme et. al., 01]
Eburnamine	Apocynaceae		163 μ M ²	- ¹⁰	[Addae-Kyereme et. al., 01]
Pléiomutinine	Apocynaceae		5.2 μ M ²	- ¹⁰	[Addae-Kyereme et. al., 01]
(-) Roemréfidine	Hernandiaceae	0.71 μ M ⁷	0.58 μ M ⁸	5.98 mg/Kg/4j ⁷	[Muñoz et. al., 99]
(S)-réticuline	Hernandiaceae		16.4 μ M ¹²		[Rasoanaivo et. al., 98]
Hervéline A	Hernandiaceae		3.3 μ M ¹²	15 % ⁶	[Rasoanaivo et. al., 98]
Hervéline B	Hernandiaceae		1.7 μ M ¹²		[Rasoanaivo et. al., 98]
Hervéline C	Hernandiaceae		2.8 μ M ¹²		[Rasoanaivo et. al., 98]
Hervéline D	Hernandiaceae		2.2 μ M ¹²		[Rasoanaivo et. al., 98]

Souches: ¹: T 996 ²: K1 ³: FcB1 ⁴: W2 ⁵: D6 ⁶: *P. berghei yoelii* N67
⁷: NK 65 ⁸: INDO ⁹: NF54 ¹⁰: ANKA ¹¹: FCR-3 ¹²: FCM29/Cameroon
¹³: ANKA en OF1 souris ¹⁴: 2087 ¹⁵: *P. vinckei petteri* 279BY ¹⁶: 3D7 ¹⁷: Dd2

TABLEAU # 2. Suite. Alcaloïdes antipaludiques d'origine naturelle.

COMPOSÉ	FAMILLE	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquine sensible CI ₅₀	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquine résistante CI ₅₀	<i>P. berghei</i> , DE ₅₀ ou % suppression parasitémie	REFERENCES
Imbiline-1	Annonaceae	550 ng/ml ⁵	280 ng/ml ⁴		[Muhammad et. al., 01]
Dioncopeltine A	Ancistrocladaceae	21 ng/ml ⁹		38 ng/ml ¹⁰ ; 0.003 % ¹³	[François et. al., 95; François et. al., 97]
Dioncophylline A	Ancistrocladaceae	1443 ng/ml ⁹		961 ng/ml ¹⁰ ; 2.96 % ¹³	[François et. al., 95; François et. al., 97]
Dioncophylline B	Ancistrocladaceae	224 ng/ml ⁹		228 ng/ml ¹⁰ ; 1.86 % ¹³	[François et. al., 95; François et. al., 97]
Dioncophylline C	Ancistrocladaceae			0.00 % ¹³	[François et. al., 97]
Fébrifugine	Saxifragaceae	0.7 nM ¹¹	1.2 nM ²	1.0 µmol/Kg	[Takaya et. al., 99]
Isofébrifugine	Saxifragaceae	3.4 nM ¹⁰	1.8 nM ²		[Takaya et. al., 99]
Benz[glisoquinoléine- 5, 10 dione	Rubiaceae		0.84 µg/ml ²		[Solis et. al., 95]
Tubulosine	Rubiaceae	0.006 µg/ml ¹⁴	0.011 µg/ml ⁸	0.05 ¹⁵ ; 0.45 ⁷ mg/Kg/j	[Sauvain et. al., 96]
Psychotrine	Rubiaceae	0.14 µg/ml ¹⁴	0.39 µg/ml ⁸	> 2 ⁷ mg/Kg/j	[Sauvain et. al., 96]
Cephaéline	Rubiaceae	0.027 µg/ml ¹⁴	0.011 µg/ml ⁸	6 ⁷ mg/Kg/j	[Sauvain et. al., 96]
E,E- 2, 4- Octadienamide	Euphorbiaceae	193 µM ¹⁶	200 µM ¹⁷		[Sittie et. al., 98]
Amidéline	Euphorbiaceae	87 µM ¹⁶	91 µM ¹⁷		[Sittie et. al., 98]

Souches: ¹: T 996
⁷: NK 65
¹³: ANKA en OF1 souris

²: K1
⁸: INDO
¹⁴: 2087

³: FcB1
⁹: NF54
¹⁵: *P. vinckei petteri* 279BY

⁴: W2
¹⁰: ANKA

⁵: D6
⁶: *P. berghei yoelii* N67

¹¹: FCR-3
¹²: FCM29/Cameroon
¹⁶: 3D7
¹⁷: Dd2

TABLEAU # 2. Suite. Alcaloïdes antipaludiques d'origine naturelle.

Dans le groupe des terpènes, on trouve aussi des composés intéressants, spécialement l'artémisinine (22). Ce sesquiterpène avec une fonction endopéroxyde, isolée de *Artemisia annua*, est considéré comme le représentant des composés naturels les plus puissants contre le paludisme (CI_{50} de l'ordre de quelques dizaines de nM contre des souches de *P. falciparum* sensibles ou résistantes) [Caniato, et al., 2003].. Parmi les sesquiterpènes isolées, on peut également mentionner le nardopéroxyde (23) et l'isonardopéroxyde (24) (*Nardostachys chinensis* Batalin, *Valerianaceae*) qui ont des sélectivités comparables à celle de la quinine (1). Le nardopéroxyde (23) a une CI_{50} de 1.5 μ M contre une souche chloroquino sensible de *P. falciparum*, alors que l'isonardopéroxyde (24) a une CI_{50} de 0.6 μ M [Takaya et al., 1998]. Du groupe des triterpènes, on remarque l'acide bétulinique (25) qui a une activité modérée. Contre une souche sensible de *Plasmodium*, il présente une CI_{50} de 25.9 μ g/ml et contre la souche résistante une CI_{50} de 19.6 μ g/ml [Steele et al., 1999]. Un autre type de triterpènes sont les limonoïdes desquels nous citerons la gédunine (26). Ce terpène polyoxygéné présente des CI_{50} = 25.9 μ g/ml et CI_{50} = 19.6 μ g/ml contre des souches sensible et résistante [MacKinnon et al., 1997]. On peut également citer des triterpènes avec des activités comparables à celles déjà présentée, mais ces composés sont cytotoxique et ont donc une faible sélectivité. On peut citer les neurolénines A (27) et B (28) (CI_{50} = 0.92 μ M et CI_{50} = 0.92 μ M, respectivement) [François et al., 1996]. La Figure # 5 présente les structures des terpènes mentionnés et le Tableau # 4 présente un bilan de leurs activités. Finalement, le Tableau # 5 présente un bilan des quassinoides, coumarines, lignanes et divers composés actifs isolés de la nature.

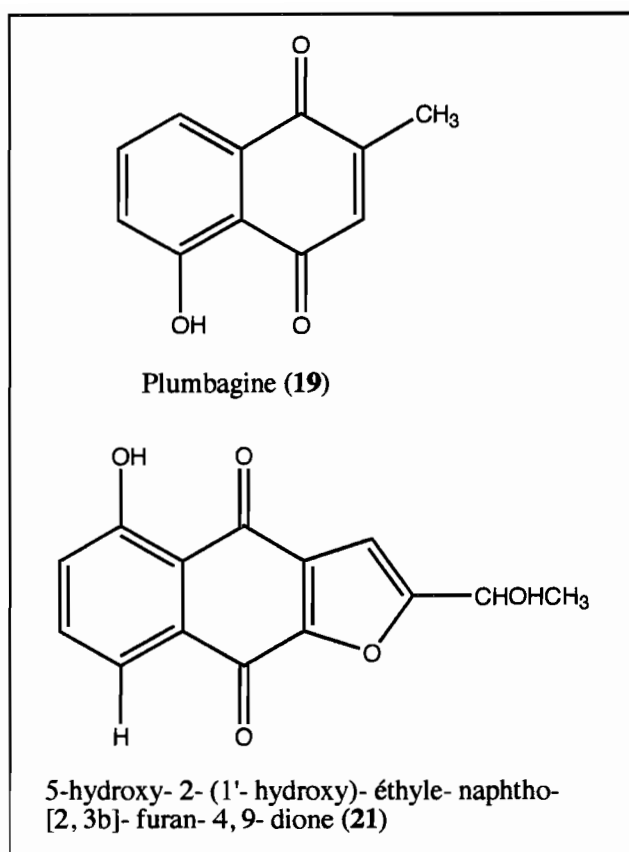


FIGURE # 4. Quinones antipaludiques d'origine naturelle.

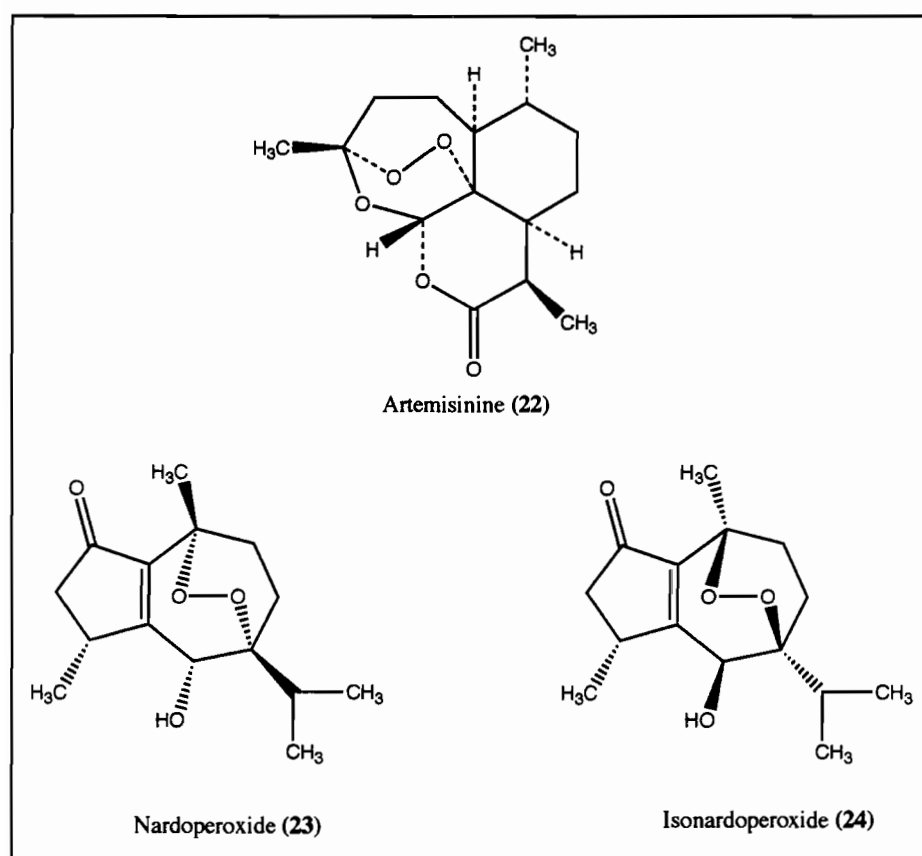


FIGURE # 5. Terpènes antipaludiques d'origine naturelle.

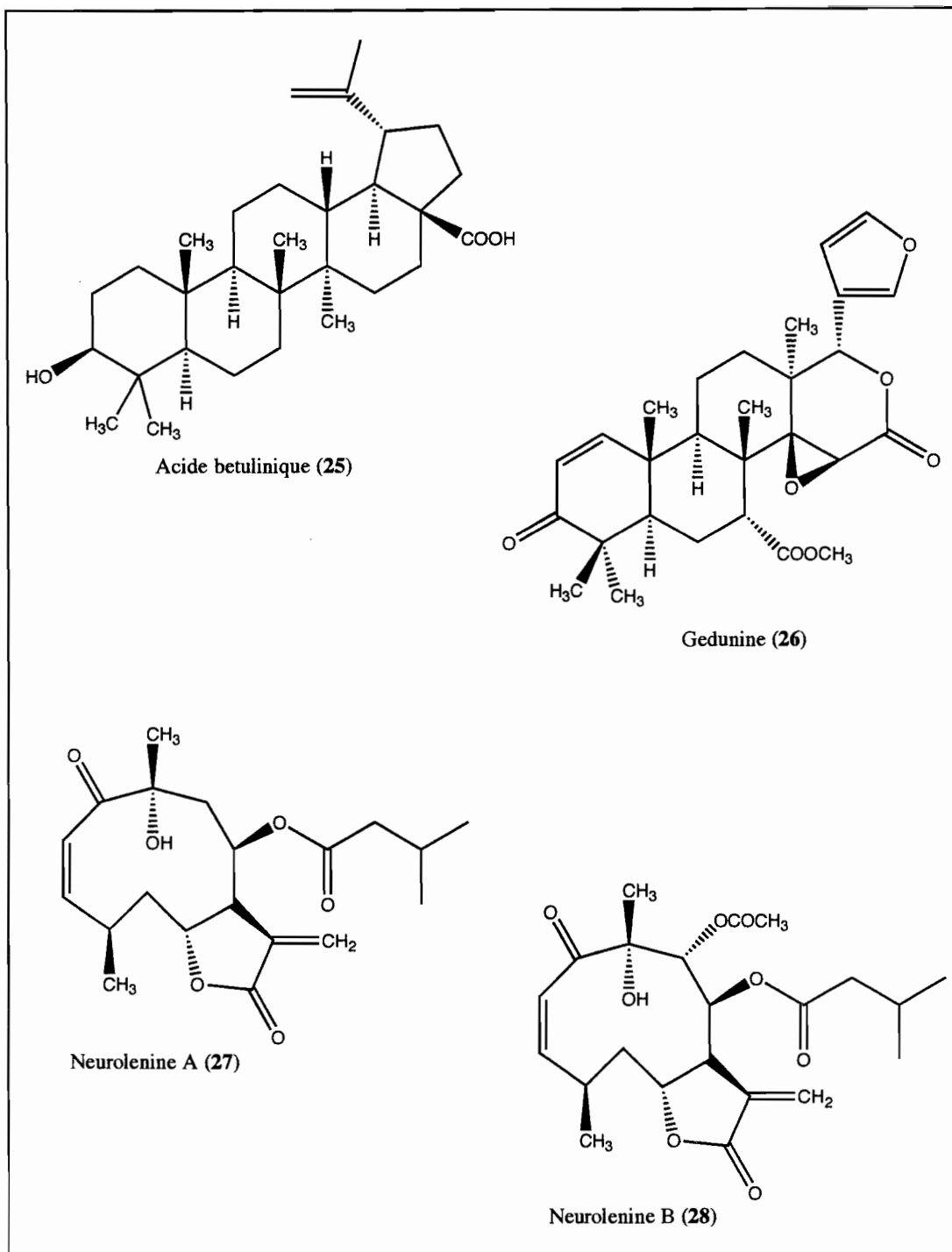


FIGURE # 5. Suite. Terpènes antipaludiques d'origine naturelle.

COMPOSÉ	FAMILLE	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- sensible, CI ₅₀	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- résistante, CI ₅₀	<i>P. berghei</i> , DE ₅₀ ou % suppression parasitémie	REFERENCES
Plumbagine	Nephentaceae	0.27 μM^1			[Likhitwitayawind et. al., 98a]
2- Méthyl-naphthazarine	Nephentaceae	5.79 μM^1			[Likhitwitayawind et. al., 98a]
Octadécyl cafféate	Nephentaceae	11.76 μM^1			[Likhitwitayawind et. al., 98a]
Isoshinanolone	Nephentaceae	20.83 μM^1			[Likhitwitayawind et. al., 98a]
Drosérone	Nephentaceae	22.06 μM^1			[Likhitwitayawind et. al., 98a]
5- Hydroxy- 2- (1'-hydroxy)- éthyl- naphtho- [2, 3- b]- furan- 4, 9- dione	Bignoniaceae		0.677 μM^2	0.167 μM	[Perez et. al., 97]
5- Hydroxy- 2- (1'-hydroxy)- éthyl- naphtho- [2, 3- b]- furan- 4, 9- dione	Bignoniaceae		0.677 $\mu\text{g/ml}^4$	0.167 μM	[Pérez et. al., 97]
5, 8- dihydroxy- 2- (1'-hydroxyéthyl)- naphtho- [2, 3- b]- furan- 4, 9- dione	Bignoniaceae			8.40 μM	[Pérez et. al. 97]

Souches: ¹: T 9/94

²: FcB2

³:NF54

⁴: K1

⁵: 3D7

TABLEAU # 3. Quinones antipaludiques d'origine naturelle.

COMPOSÉ	FAMILLE	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- sensible IC ₅₀	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- résistante IC ₅₀	<i>P. berghei</i> , DE ₅₀ ou % suppression parasitémie	REFERENCES
2- Acétyl- 7- méthoxy- 8 hydroxynaphtho- [2, 3- b]- furan- 4, 9- dione	Bignoniaceae			13.1 μ M	[Pérez et. al. 97]
Knipholone anthrone	Asphodelaceae	0.42 μ M ³	0.38 μ M ⁴		[Bringmann et. al., 99]
Knipholone	Asphodelaceae	1.70 μ M ³	1.06 μ M ⁴		[Bringmann et. al., 99]
6'- O- Methylknipholone	Asphodelaceae	2.64 μ M ³	2.37 μ M ⁴		[Bringmann et. al., 99]
4'- O- Déméthylknipholone	Asphodelaceae	1.55 μ M ³	1.80 μ M ⁴		[Bringmann et. al., 99]
1- Acétoxyméthyl- 8- hydroxynaphto[2, 3- c] furan – 4, 9- dione	Asphodelaceae	23 μ M ⁵	52 μ M ⁴		[Bezabih et. al., 01]
1- Acétoxyméthyl- 5, 8- dihydroxynaphto[2, 3- c] furan – 4, 9- dione	Asphodelaceae	33 μ M ⁵	52 μ M ⁴		[Bezabih et. al., 01]
5, 8- dihydroxy 1- 1 – hydroxymethylnaphto [2, 3- c] furan – 4, 9- dione	Asphodelaceae	34 μ M ⁵	55 μ M ⁴		[Bezabih et. al., 01]
1- Hydroxybenzoiso- chromanquinone	Rubiaceae		2.66 μ g/ml ⁴		[Solis et. al., 95]

Souches: 1: T 9/94

2: FcB2

3: NF54

4: K1

5: 3D7

TABLEAU # 3. Suite. Quinones antipaludiques d'origine naturelle.

COMPOSÉ	FAMILLE	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- sensible, CI ₅₀	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- résistante, CI ₅₀	<i>P. berghei</i> , DE ₅₀ ou % suppression parasitémie	REFERENCES
Neurolénine A	Asteraceae	0.92 μM^1			[François et. al., 96]
Neurolénine B	Asteraceae	0.62 μM^1			[François et. al., 96]
Neurolénine C/D (1:3)	Asteraceae	7.35 μM^1			[François et. al., 96]
Neurolénine C/D (3:2)	Asteraceae	0.62 μM^1			[François et. al., 96]
Lobatine A	Asteraceae	15.62 μM^1			[François et. al., 96]
Lobatine B	Asteraceae	16.51 μM^1			[François et. al., 96]
9- α - Hydroxy- 8 β - isovalérianyloxy- calyculatolide	Asteraceae	19.27 μM^1			[François et. al., 96]
16, 17- Dihydrobrachycalixolide	Asteraceae	8.3 μM^2 , 27 μM^3	5.9 μM^4 , 32 μM^5		[François et. al., 96]
Nardopéroxyde	Valerianaceae	1.5 μM^1			[Takaya et. al., 98]
Isonardopéroxyde	Valerianaceae	0.92 μM^1			[Takaya et. al., 98]
Nardosinone	Valerianaceae	4.5 μM^1			[Takaya et. al., 98]
Acide bétulinique	Ancistrocladaceae, Dioncophyllaceae, Euphorbiaceae	25.9 $\mu\text{g/ml}^6$, 10.46 $\mu\text{g/ml}^1$	19.6 $\mu\text{g/ml}^7$	- ⁸	[Steele et. al., 99; Bringmann et. al., 97]
Acide ursolique	Rubiaceae	15.12 $\mu\text{g/ml}^3$	18.10 $\mu\text{g/ml}^9$		[Steele et. al., 99; Bringmann et. al., 97]
Muzanzagénine	Liliaceae	61 μM^2 , 23 μM^3	163 μM^4 , 16 μM^5		[Traore- Keita et. al., 00b]

Souches: ¹: NF54, clone A1A9

²: K39

³: 3D7

⁴: V1/S

⁵: Dd2

⁶: T9-96

⁷: K1

⁸: NK65

⁹: W2

TABLEAU # 4. Terpènes antipaludiques d'origine naturelle.

COMPOSÉ	FAMILLE	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- sensible, CI ₅₀	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- résistante, CI ₅₀	<i>P. berghei</i> , DE ₅₀ ou % suppression parasitémie	REFERENCES
Gédunine	Meliaceae	39 ng/ml ¹	20 ng/ml ² , 1.25 µg/ml ³		[MacKinnon et. al., 97; Bickii et. al., 00]
Méthylangolensate	Meliaceae		5.39 µg/ml ³		[Bickii et. al., 00]
6- méthylhydroxy- angolensate	Meliaceae		21.59 µg/ml ³		[Bickii et. al., 00]
7- Déacétylkhivorin	Meliaceae		5.08 µg/ml ³		[Bickii et. al., 00]
1- Déacétylkhivorin	Meliaceae		9.63 µg/ml ³		[Bickii et. al., 00]
Swieténolide	Meliaceae		18.56 µg/ml ³		[Bickii et. al., 00]
6- Acétyl- swieténolide	Meliaceae		7.46 µg/ml ³		[Bickii et. al., 00]
Fissinolide	Meliaceae	48 µM ⁴			[Khalid et. al., 98]
2, 6- Dihydroxy- fissinolide	Meliaceae	0.12 µM ⁴			[Khalid et. al., 98]
Méthyl- 3β- acétoxy- 6- hydroxy-1 –oxoméliac- 14- enoate	Meliaceae	> 0.20 µM ⁴			[Khalid et. al., 98]

Souches: ¹: NF54, clone A1A9

²: K39

³: 3D7

⁴: V1/S

⁵: Dd2

⁶: T9-96

⁷: K1

⁸: NK65

⁹: W2

TABLEAU # 4. Suite. Terpènes antipaludiques d'origine naturelle.

COMPOSÉ	FAMILLE ^{a, b, c}	<i>P. falciparum</i> , souche chloroquino-sensible CI ₅₀	<i>P. falciparum</i> , souche chloroquino-résistante, CI ₅₀	<i>P. berghei</i> , DE ₅₀ ou % suppression parasitémie	REFERENCES
Brucéolide	Simarubaceae ^a			1.1 mg/ Kg/ j ¹	[Caniato et. al., 03]
3, 15- di- O'-acetylbrucéolide	Simarubaceae ^a			0.46 mg/ Kg/ j ¹	[Caniato et. al., 03]
Glaucarubolone	Simarubaceae ^a	0.125 µg/ml ²	0.20 µg/ml ³		[Dou et. al., 96]
Holacanthone	Simarubaceae ^a	0.010 µg/ml ²	0.012 µg/ml ³		[Dou et. al., 96]
11- O- trans- p-coumaroyl amarolide	Simarubaceae ^a	0.92 µg/ml ²	0.75 µg/ml ³		[Dou et. al., 96]
Chaparrinone	Simarubaceae ^a	0.25 µg/ml ² , 0.037 µg/ml ⁵	0.20 µg/ml ³	0.11 % ⁶	[Dou et. al., 96; François et. al., 98]
15- Désacétylundulatone	Simarubaceae ^a	0.047 µg/ml ⁵		0.023 % ⁶	[François et. al., 98]
14- Hydroxychaparrinone	Simarubaceae ^a	0.188 µg/ml ⁵		0.18 % ⁶	François et. al., 98]
6- α- Tiogloyloxy-glaucaroubol	Simarubaceae ^a	0.257 µg/ml ⁵		1.62 % ⁶	[François et. al., 98]
Chaparrine	Simarubaceae ^a	0.25 µg/ml ²	0.35 µg/ml ³		[Dou et. al., 96]
Eurycomanol	Simarubaceae ^a		1.231- 4.899 µM ⁴		[Ang et. al., 95]
Eurycomanol 2- O- β- D-glucopiranoside	Simarubaceae ^a		0.389- 3.498 µM ⁴		[Ang et. al., 95]
13β, 18-Dihydroeurycomanol	Simarubaceae ^a		0.504- 2.343 µM ⁴		[Ang et. al., 95]

Type de composés: ^a: Quassinoides

^b: Coumarines

^c: Lignanes

^d: Divers

Souches: ¹: FCR-3 en souris

²: D6

³: W2

⁴: 9

⁵: NF54 clone A1A9

⁶: ANKA en OF1 souris

⁷: K1

⁸: poW

⁹: Dd2

¹⁰: 3D7

¹¹: T_{9/94}

TABLEAU # 5. Quassinoides, coumarines, lignanes et divers antipaludiques d'origine naturelle.

COMPOSÉ	FAMILLE	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- sensible CI ₅₀	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- résistante, CI ₅₀	<i>P. berghei</i> , DE ₅₀ ou % suppression parasitémie	REFERENCES
Samadérine X	Simarubaceae ^a		0.014 μ M ⁷		[Kitagawa et. al., 96]
Samadérine Z	Simarubaceae ^a		0.071 μ M ⁷		[Kitagawa et. al., 96]
Samadérine E	Simarubaceae ^a		0.056 μ M ⁷		[Kitagawa et. al., 96]
Samadérine B	Simarubaceae ^a		0.21 μ M ⁷		[Kitagawa et. al., 96]
3', 4'- Dihydroxy- 5, 7- diméthoxy- 4- phénylcoumarin	Rubiaceae ^b	24.3 μ g/ml ⁸	12.8 μ g/ml ⁹		[Köhler et. al., 01]
3', 4', 8'- Trihydroxy- 5, 7- diméthoxy- 4- phenylcoumarin	Rubiaceae ^b	31.0 μ g/ml ⁸	18.0 μ g/ml ⁹		[Köhler et. al., 01]
O- Méthylexostemine	Rubiaceae ^b	3.6 μ g/ml ⁸	1.6 μ g/ml ⁹		[Köhler et. al., 01]
Exomexine A	Rubiaceae ^b	41.5 μ g/ml ⁸	16.5 μ g/ml ⁹		[Köhler et. al., 01]
Exomexine B	Rubiaceae ^b	40.5 μ g/ml ⁸	14.0 μ g/ml ⁹		[Köhler et. al., 01]
2'- Epicycloisobrachy- coumarinone époxide	Asteraceae ^b	160 μ M ¹⁰	54 μ M ⁹		[Oketch- Rabah et. al., 97]
Cycloisobrachycoumarinone époxide	Asteraceae ^b	111 μ M ¹⁰	54 μ M ⁹		[Oketch- Rabah et. al., 97]

Type de composés: ^a: Quassinoides ^b: Coumarines ^c: Lignanes

Souches: ¹: FCR-3 en souris

²: D6

³: W2

⁴: 9

^d: Divers

⁵: NF54 clone A1A9

⁶: ANKA en OF1 souris

⁷: K1

⁸: poW

⁹: Dd2

¹⁰: 3D7

¹¹: T_{9/94}

TABLEAU 5. Suite. Quassinoides, coumarines, lignanes et divers antipaludiques d'origine naturelle.

COMPOSÉ	FAMILLE	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino-sensible IC ₅₀	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- résistante IC ₅₀	<i>P. berghei</i> , DE ₅₀ ou % suppression parasitémie	REFERENCES
(+)- Nyasol	Liliaceae ^c	12 μ M ¹⁰	12 μ M ⁹		[Oketch- Rabah et al., 97]
7- O- Méthylgarcinone E	Guttiferae ^d	2.50 μ g/ml ¹¹			[Likhitwitayawuid et al., 98b]
Cowamine	Guttiferae ^d	3.00 μ g/ml ¹¹			[Likhitwitayawuid et al., 98b]
Cowanol	Guttiferae ^d	1.60 μ g/ml ¹¹			[Likhitwitayawuid et al., 98b]
Cowaxanthone	Guttiferae ^d	1.50 μ g/ml ¹¹			[Likhitwitayawuid et al., 98b]
β - Mangostin	Guttiferae ^d	3.00 μ g/ml ¹¹			[Likhitwitayawuid et al., 98b]

Type de composés: ^a: Quassinoides ^b: Coumarines ^c: Lignanes ^d: Divers
Souches: ¹: FCR-3 en souris ²: D6 ³: W2 ⁴: 9 ⁵: NF54 clone A1A9 ⁶: ANKA en OF1 souris
⁷: K1 ⁸: poW ⁹: Dd2 ¹⁰: 3D7 ¹¹: T_{9/94}

TABLEAU 5. Suite. Quassinoides, coumarines, lignanes et divers antipaludiques d'origine naturelle.

D.Rappel sur la genèse des produits de synthèse antipaludiques.

À partir de 1820, la quinine (1) isolée des quinquinas devient un des premiers composés chimiques purs permettant de traiter une maladie. Soixante-dix années plus tard, Paul Ehrlich soigne deux malades atteints de paludisme en utilisant le bleu de méthylène (30) [Vennerstrom et al., 1995]. La découverte de la quinine (1), de l'artémisinine (22) et du bleu de méthylène (30) a donné les bases structurales de la synthèse de nouveaux médicaments. La plus grande partie des découvertes en chimie de synthèse est issue d'efforts de recherche effectués durant des guerres importantes.

En 1925, la pamaquine (31) a été synthétisée par modification du squelette de la quinine (1) [Egan, 2001]. En 1932, la mépacrine (32) a été produite à partir de la structure du bleu de méthylène (30). Ces médicaments sont actifs contre les étapes érythrocytaires de *P. falciparum*. La pamaquine (31) et la mépacrine (32) ont été grandement utilisées pendant la seconde guerre mondiale. La chloroquine (33) a été synthétisée en 1934 mais elle a commencé à être utilisée qu'à partir de 1946 parce qu'elle était considérée à l'époque comme trop toxique. La chloroquine (33) est devenu le médicament le plus important effectif contre le paludisme. En 1950, le premier cas de résistance à la chloroquine (33) est apparu dû à son utilisation en prophylaxie. Pendant la deuxième guerre mondiale, les Anglais ont synthétisé le proguanil (34) qui a servi au développement de la pyriméthamine (35). Les Américains, après la guerre de Vietnam, ont synthétisé la méfloquine (36) et l'halofantrine (37) [Wiesner et al., 2003].

De la médecine chinoise, une série de dérivés synthétiques ont été développés à partir de l'artémisinine (22). Parmi les dérivés utilisés ces 20 dernières années, on peut

mentionner l'artéméter (38), l'artéether (39) et l'artésunate (40). La Figure 6 présente les structures de tous les composés de synthèse mentionnés dans ce résumé.

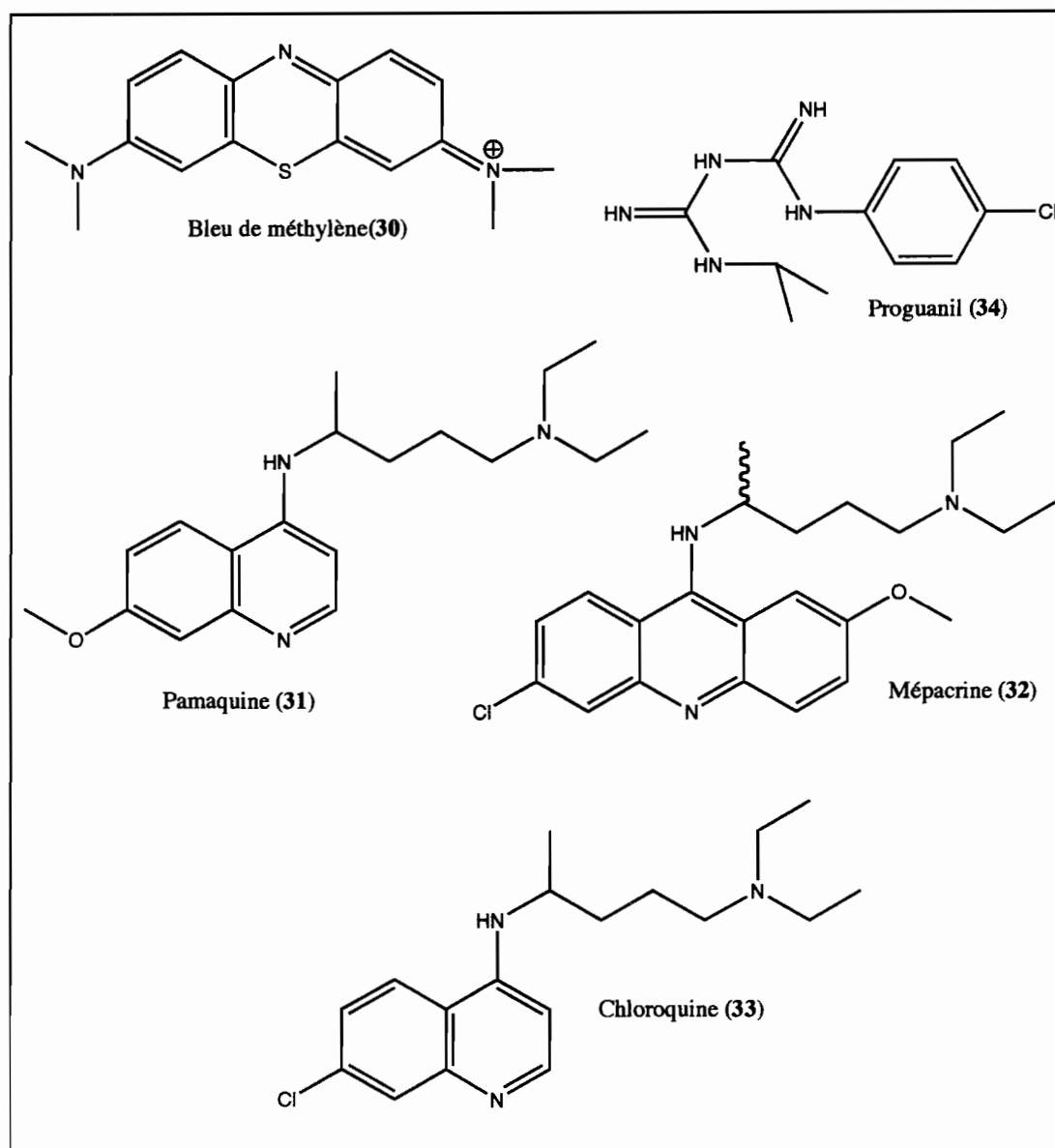


FIGURE # 6. Composés antipaludiques d'origine synthétique.

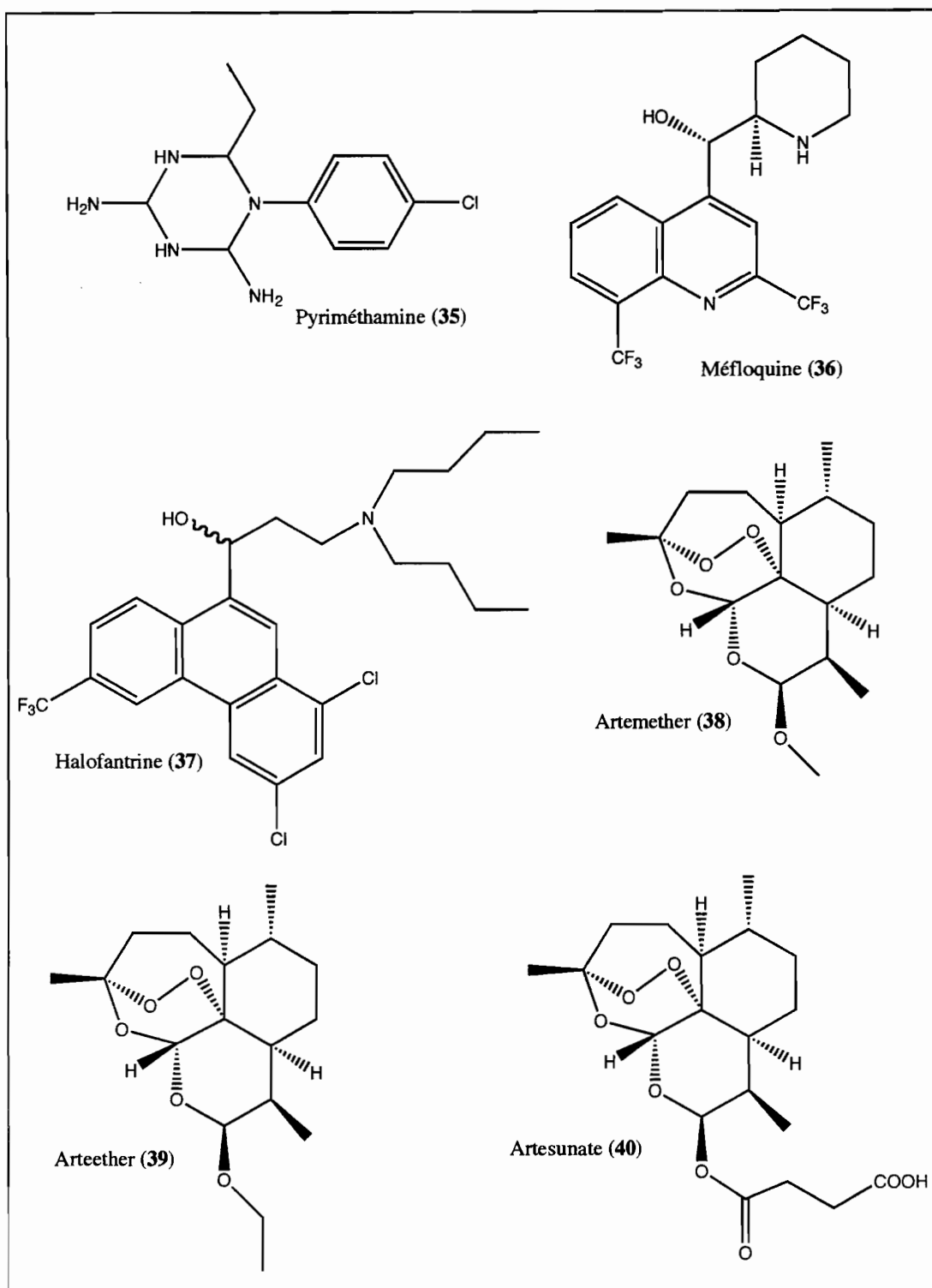


FIGURE # 6. Suite. Composés antipaludiques d'origine synthétique.

E.Rappel sur la genèse des évaluations pharmacologiques des antipaludiques.

Les premières observations biologiques sur le paludisme viennent des anciennes médecines chinoise et grec. En ce temps-là, deux types de fièvre, les fièvres tertiaire et quaternaire, ont été différenciés. Le père de la médecine moderne, Hipocrate, a présenté la fièvre quaternaire comme la moins dangereuse [Sherman, 1998]. Avant 1920, les extraits végétaux et les composés isolés ont été évalués directement sur l'homme. Postérieurement, les évaluations ont été faites sur des canaris infectés avec *P. relictum* ou paludisme aviaire. En 1935, *P. relictum* a été remplacé par *P. gallinaceum* utilisant des pigeonceaux infectés. À partir de 1948 et grâce à la découverte de parasites de rongeurs africains comme *P. berghei*, les modèles expérimentaux sur les oiseaux ont été remplacés par les modèles murins de malaria que sont beaucoup plus pratiques à manipuler [Wiesner et al., 2003].

Les études sur les modèles animaux avec les parasites qui infectent l'homme utilisent les singes. Ce sont des évaluations d'accessibilité très limitée. En 1976, la première culture *in vitro* de *P. falciparum* a été réalisée dans un milieu nutritif supplémenté avec des érythrocytes humains [Trager et al., 1976]. Jusqu'à présent, cet essai était utilisé pour évaluer de grandes quantités d'extraits et de composés. Aujourd'hui, la biologie moléculaire appliquée à la recherche sur le paludisme a permis la description du génome du *P. falciparum* [Bahl et al., 2002]. Cette description permet l'identification et l'exploration de voies métaboliques parasitaires originales qui peuvent être utilisées comme cibles de nouveaux médicaments.

F. Mécanismes et cibles d'action

Il y a cinq compartiments dans l'érythrocyte infecté par *P. falciparum* qui sont considérés comme lieu d'activité des composés antipaludiques. Ces compartiments sont la vacuole digestive, le cytoplasme, l'apicoplaste, le mitochondrion et la membrane érythrocytaire [Fidock et al., 2004]. La Figure 7 montre la localisation des différentes cibles des médicaments dans les érythrocytes infectés par *P. falciparum*..

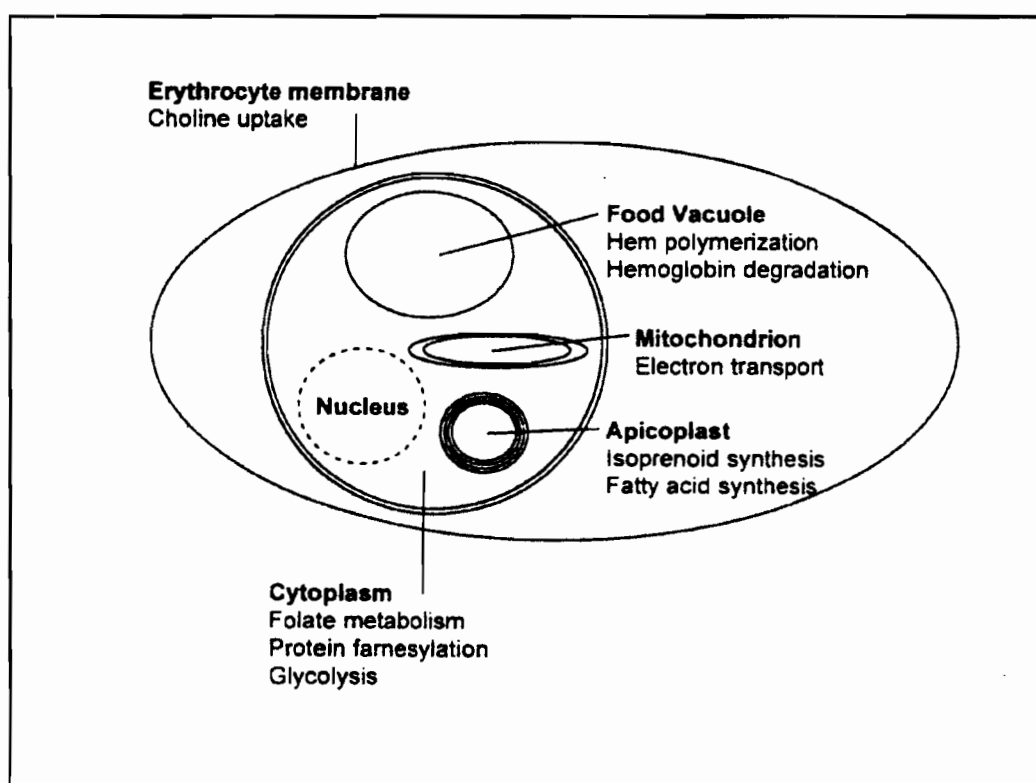


FIGURE # 7. Localisation des différentes cibles des médicaments dans les érythrocytes infectés par *P. falciparum*.

La vacuole digestive est utilisée pour dégrader l'hémoglobine en peptides et acides aminés lesquels sont essentiels pour le parasite. Comme produit secondaire de cette dégradation, des groupes héminiques toxiques pour le parasite sont libérés. Le parasite transforme l'hème en hémazoïne, un dimère cristallin qui n'est pas toxique pour lui. Une des étapes de cette transformation est l'oxydation du Fe^{+2} en Fe^{+3} avec la génération d'un électron libre. Cet électron est capturé par la chaîne redox du parasite et neutralisé par production d' H_2O pour éviter des effets "radicaux libres". Un autre mécanisme possible est qu'une partie de l'hème soit excrétée dans le cytoplasme où il est dégradé par le glutathion réduit. On peut ainsi observer 4 cibles d'inhibition dans la vacuole digestive du parasite: l'hydrolyse de l'hémoglobine, la cristallisation de l'hème, l'action sur le glutathion réduit et la production de radicaux libres [Fidock et al., 2004]. Les composés actifs sur ces cibles sont des amino-4-quinoléines, les aryls méthanol, l'artémisinine (22) et ses dérivés. Des exemples d'амино-4-quinoléines qui inhibent la cristallisation de l'hème sont la chloroquine (33) et l'amodiaquine (41). La chloroquine (33) est bien tolérée, bon marché et très efficace contre les souches sensibles du parasite. L'amodiaquine (41) est utilisée contre tous les parasites et compris contre ceux qui sont résistants à la chloroquine (33) [Ridley, 2002]. Parmi les aryls méthanols, on peut mentionner la méfloquine (36) et l'halofantrine (37). Dans la famille de l'artémisinine (22), on peut mentionner les produits naturels comme l'artémisinine (22) et la dihydroartémisinine (42) et les produits hémisynthétiques comme l'artémether (38), l'artéether (39) et l'artésunate (40) [O'Neill et al., 2001.; Lin et al., 1997, Wiesner et al., 2003]. Ces composés sont métabolisés en dihydroartémisinine (42) qui est la molécule bioactive. L'activité biologique des dérivés de l'artémisinine (22) dépendent de la rupture du peroxyde grâce à l'action de l'ion Fe^{+2} du group héminique. Les

artemisinines agissent plus vite que les autres composés et ils sont très peu toxiques [Price, 2000; Leonardi et al., 2001].

Concernant les composés qui sont en usage clinique, on peut mentionner la combinaison de la luméfantrine (43) et de l'artémether (38) appelé Riamet® ou Co-artem® pour traiter les cas de *P. falciparum* simples [Wiesner et al., 2003]. D'autres exemples sont ceux de la pyronaridine (44), et la tafénoquine (45). La pyronaridine (44) est le plus puissant dérivé des amino-4-quinoléïnes et il est actif contre les parasites résistants à la chloroquine (33). Alors que la tafénoquine (45) est active sur des souches multi-résistantes. Non seulement la tafénoquine (45) est active contre le stade érythrocytaire, mais elle est active contre le parasite dans le foie et contre les gamétocytes [Wiesner et al., 2003]. La Figure # 8 englobe les structures des composés mentionnés dans ce résumé.

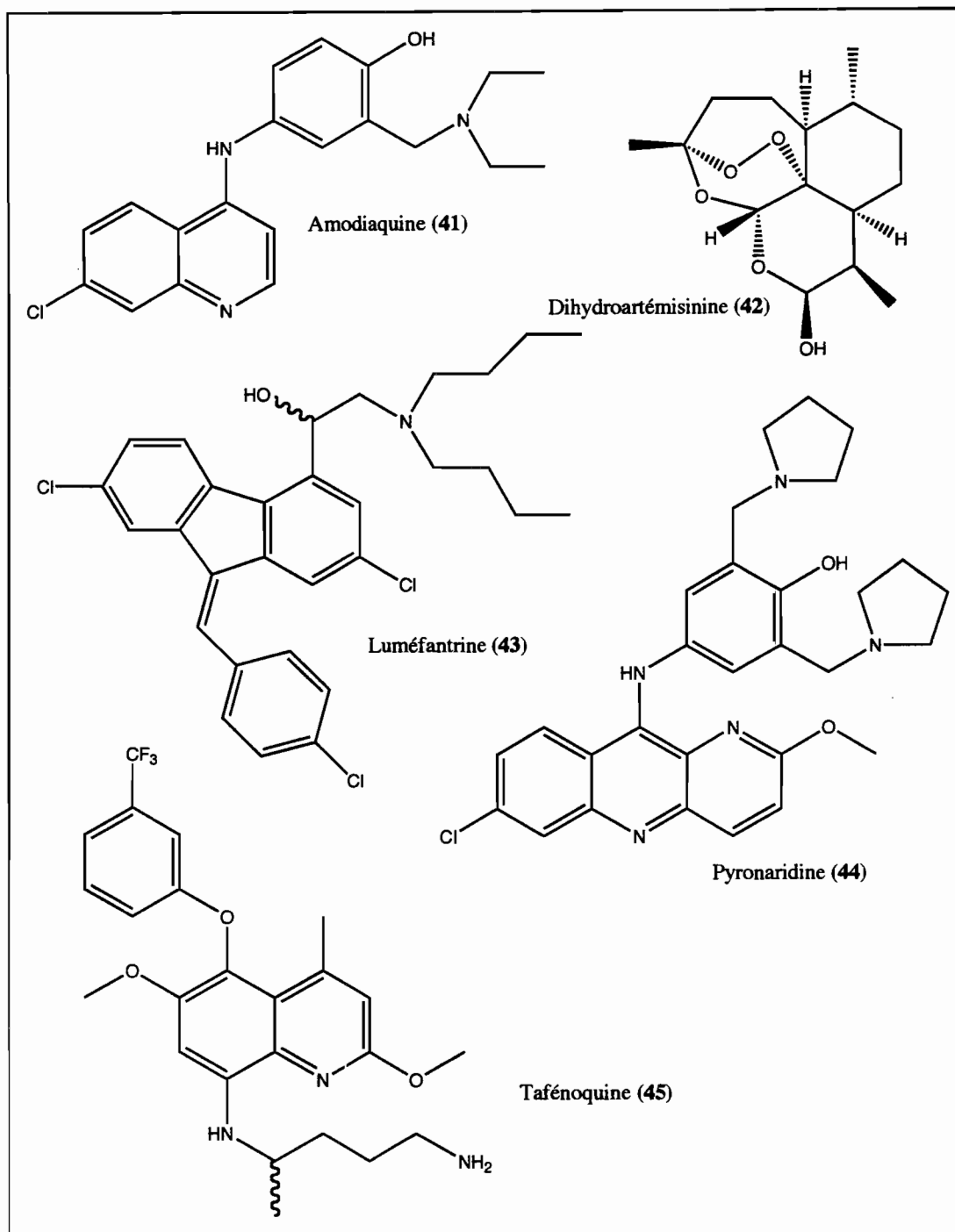


FIGURE # 8. Composés actifs sur la vacuole digestive.

Le cytoplasme. Dans ce milieu, on peut distinguer 5 mécanismes biochimiques principaux susceptibles d'être des cibles pour des inhibiteurs: le métabolisme des folates, la farnélation des protéines, la glycolyse, le métabolisme du glutathion et la signalisation cellulaire [Fidock et al., 2004]. La combinaison sulfadoxine-pyriméthamine est le médicament le plus utilisé au niveau du métabolisme des folates [Newton et al., 1999]. La pyriméthamine (46) inhibe la dihydrofolate réductase alors que la sulfadoxine (47) inhibe la dihydroptéroate synthase. Le problème de cette combinaison est qu'elle génère rapidement des résistances et utilisée en prophylaxie, elle peut donner une nécrose toxique épidermique. Le nouveau composé en développement clinique est le Lap-dap qui est une combinaison de chlorproguanil (48) et dapsone (49). Les deux composés sont bon marché, bien étudiés et ont une demi-vie courte dans le plasma, ce qui n'est pas favorable à l'apparition de résistance. Actuellement, le Lap-dap est en développement comme une alternative pour remplacer la combinaison sulfadoxine-pyriméthamine [Winstanley et al., 2001; Curtis et al., 1998]. La Figure # 9 présente les composés actifs au niveau du cytoplasme.

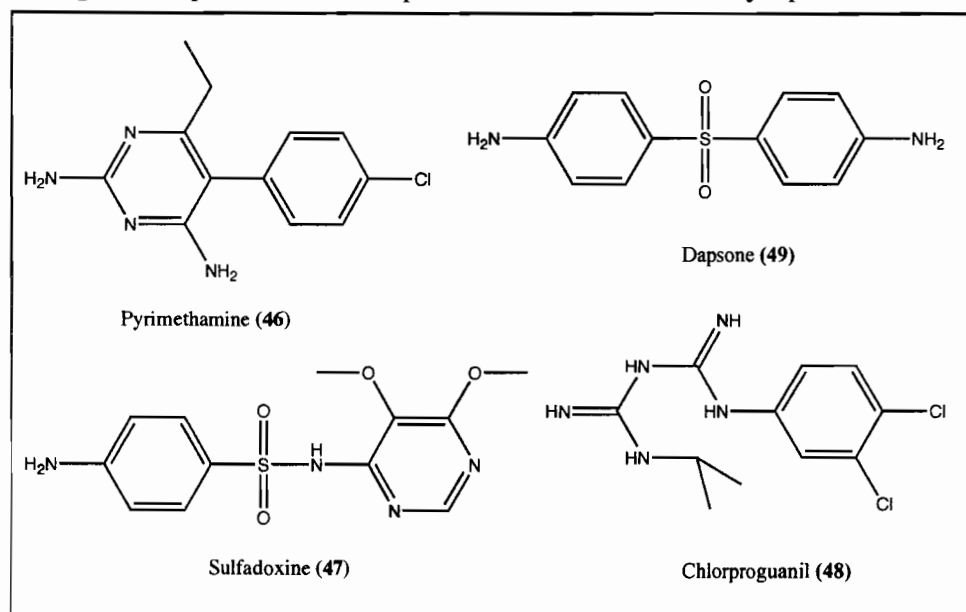


FIGURE # 9. Composés actifs au niveau du cytoplasme.

L'apicoplaste est une organelle de type plastide trouvé dans les *Plasmodium* comme dans les autres membres du phylum *Apicomplexa*. Le génome de l'apicoplaste est responsable de sa propre réplication. Il code pour les tRNAs, rRNAs, RNA polymérases et les protéines ribosomales [Kohler et al., 1997]. À l'intérieur de l'apicoplaste, il y a des enzymes du Type II d'acide gras synthase. Dans ce type de système, chaque étape de synthèse des isoprénoïdes est catalysée par une protéine [Waller et al., 1998]. Alors que dans les mammifères, les champignons et certain mycobactéries, cette synthèse est fait grâce à des protéines poly-fonctionnelles. Dans ces protéines, chaque réaction est catalysée par une région spécifique dans un seul polypeptide appelé Type I d'acide gras synthase [Heath et al., 2002].

Dans l'apicoplaste, on différencie plusieurs mécanismes qui peuvent être inhibés: la transcription, la synthèse du DNA, des protéines et des isoprénoïdes, la biosynthèse des acides gras de type II et la farnésylation des protéines [Fidock et al., 2004]. À l'intérieur de l'apicoplaste, les antibiotiques comme la rifampicine (50) inhibe le RNA de type procaryote; les tétracyclines, macrolides et lincosamides bloquent la synthèse de protéines [Ralph et al., 2001]. Les nouveaux composés en développement clinique sont la fosmidomycine (51), la FR900098 (52) et ses prodrogues. Ces composés inhibent une enzyme clef dans la voie récemment décrite de synthèse d'isoprénoïdes indépendante du mévalonate, la 1- déoxy- D-xylulose 5- phosphate (DOXP) réducto- isomérase. L'activité antipaludique de la fosmidomycine (51) est connue depuis 1998 et actuellement on sait qu'elle s'attache presque irréversiblement à l'enzyme [Jomma et al., 1999]. La fosmidomycine (51) est bien tolérée, elle a une faible toxicité et elle est active contre des souches multi-résistantes du parasite [Jomma et al., 1999]. Des études sont en cours pour identifier une molécule additionnelle permettant d'élaborer une combinaison plus puissante. D'intéressants résultats ont été publiés avec

la combinaison de la fosmidomycine (51) et de la clindamycine (53) [Wiesner et al., 2002]. Le composé FR900098 (52), un dérivé de la fosmidomycine (51), est plus actif *in vitro* et *in vivo* que son prédécesseur [Jomma et al., 1999]. La Figure # 10 montre les structures de tous les composés mentionnés agissant au niveau de cette organelle.

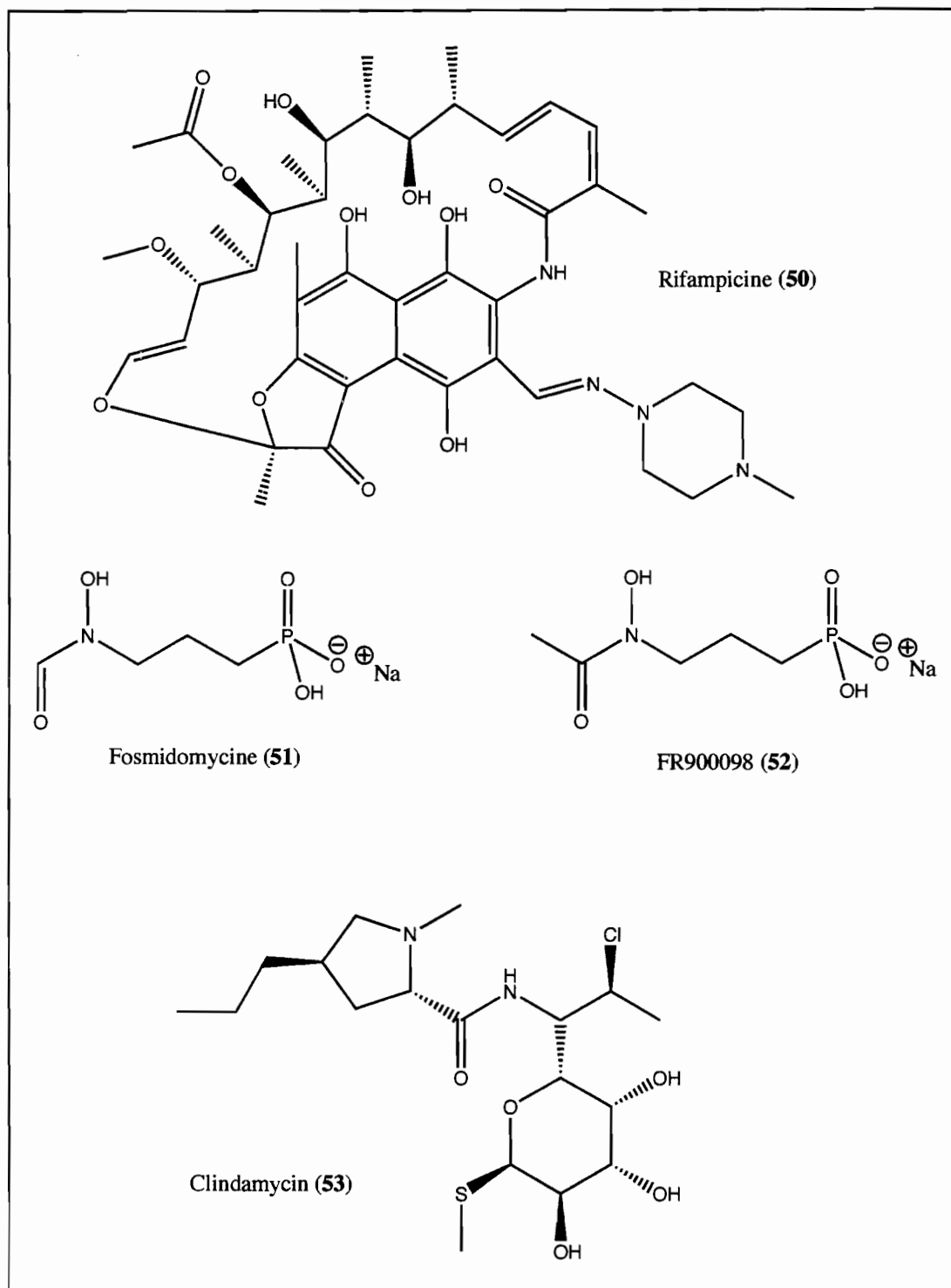


FIGURE # 10. Composés actifs au niveau de l'apicoplaste.

Le mitochondrion: Le nouveau composé en usage clinique est la Malarone[®], une combinaison d'atovaquone (54) et de proguanil (34) [Looareesuwann et al., 1999]. L'atovaquone qui est une hydroxynaphtoquinone (54) inhibe le transport électronique dans le mitochondrion à travers de la réductase du complexe cytochrome c [Fry et al., 1992]. Les structures mentionnées dans ce bilan sont dessinées dans la Figure # 11.

La membrane érythrocytaire est une barrière où le transport de la choline est réalisé. L'obtention de choline est essentielle pour le parasite car il doit synthétiser une grande quantité de membranes biologiques. Dans ce processus, la phosphatidyl- choline est utilisée comme lipide membranaire prédominant. La synthèse de la phosphatidyl- choline dépend de l'obtention de la choline du sang. L'inhibition du transport de la choline est proposée comme la cible, à partir d'un transporteur localisé dans la membrane de l'érythrocyte infecté ou dans la membrane du parasite. Les nouveaux composés en développement préclinique sont E10 (55) [Calas et al., 2000], G25 (56), MS1 (57) [Wiesner et al., 2003]. La Figure # 12 montre les structures des composés actifs au niveau de la membrane érythrocytaire.

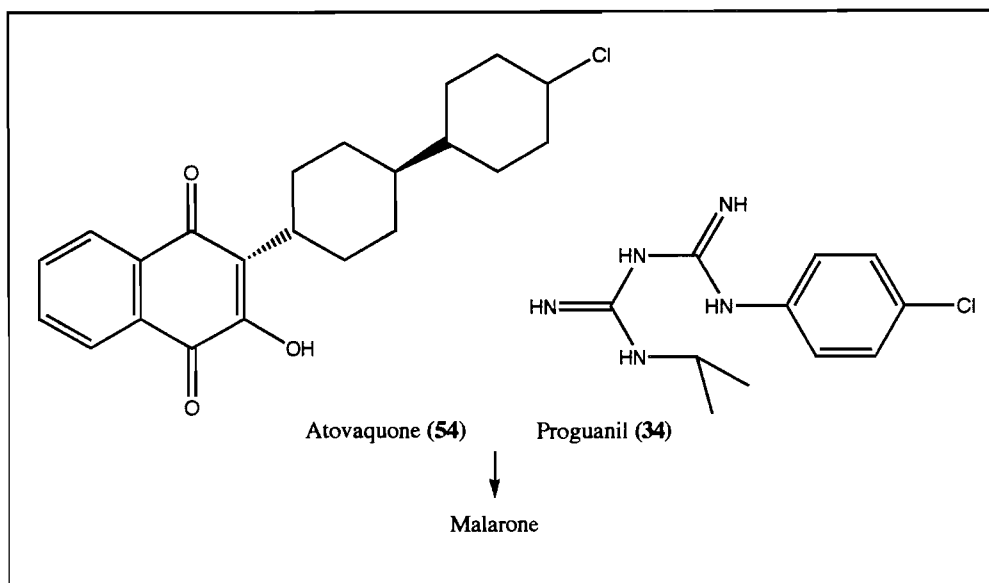


FIGURE # 11. Composés actifs au niveau du mitochondrion.

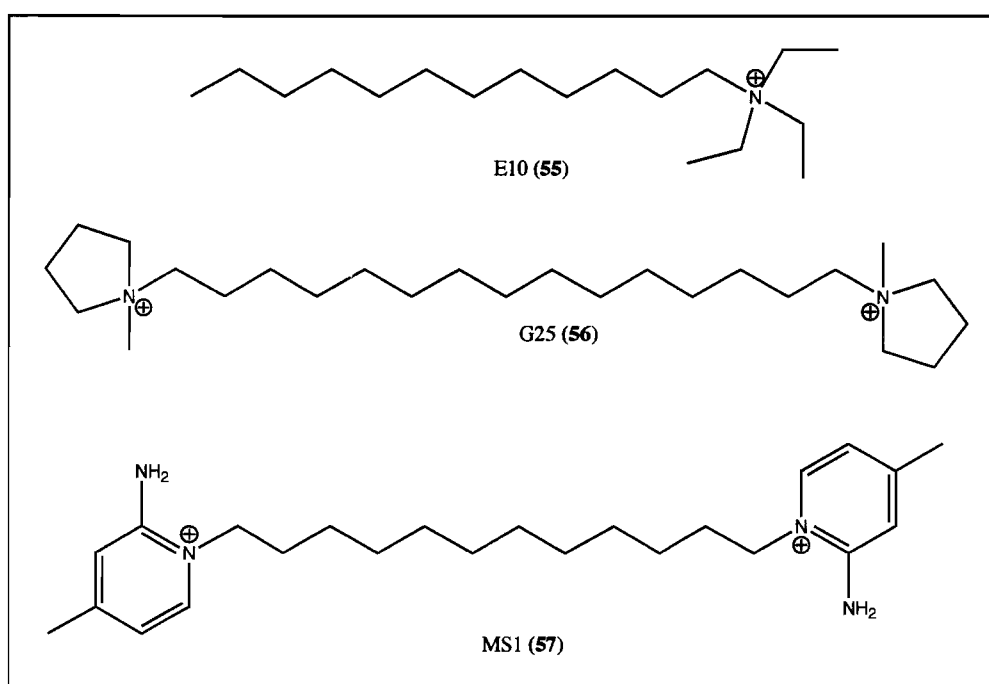


FIGURE # 12. Composés actifs au niveau de la membrane érythrocytaire.

PARTIE II

À LA RECHERCHE D'INHIBITEURS DE LA FORMATION d'HEMOZOINE (FBIT) EN BOLIVIE

1. Antécédents

A. Catabolisme de l'Hémoglobine

Parmi les diverses cibles décrites permettant la découverte de médicaments antipaludiques, la détoxification de l'hème est la cible à laquelle nous nous sommes intéressés dans ce travail. Pour expliquer le mécanisme de détoxification de l'hème, on doit présenter le catabolisme de l'hémoglobine. Le parasite de *Plasmodium* a une capacité limitée à synthétiser les acides aminés dont il a besoin pour survivre. Il doit donc utiliser ceux de son hôte. L'hémoglobine fournit ces amines acides et le parasite peut dégrader jusqu'à 80% de l'hémoglobine dans les hématies infectées [Goldberg, 1993]. Le catabolisme de l'hémoglobine se produit à l'intérieur d'une organelle spécialisée, lysosomiale et acide appelée la vacuole digestive. En plus, dans cette organelle, les acides aminés sont transportés, les radicaux d'oxygène sont détoxifiés, les médicaments sont accumulés et le fer libre peut être généré [Olliaro et al., 1995], un groupe de protéases plasmodiales a été identifié: deux aspartique protéases (plasmepsin I et II) et une cystéine protéase (falcipaine). Il y a de plus des évidences de la présence de métalloprotéases dans cette organelle [Goldberg et al., 1990]. La Figure # 13 présente la voie catabolique de la dégradation de l'hémoglobine à l'intérieur du parasite. L'obstruction de n'importe quelle voie est mortelle pour le parasite.

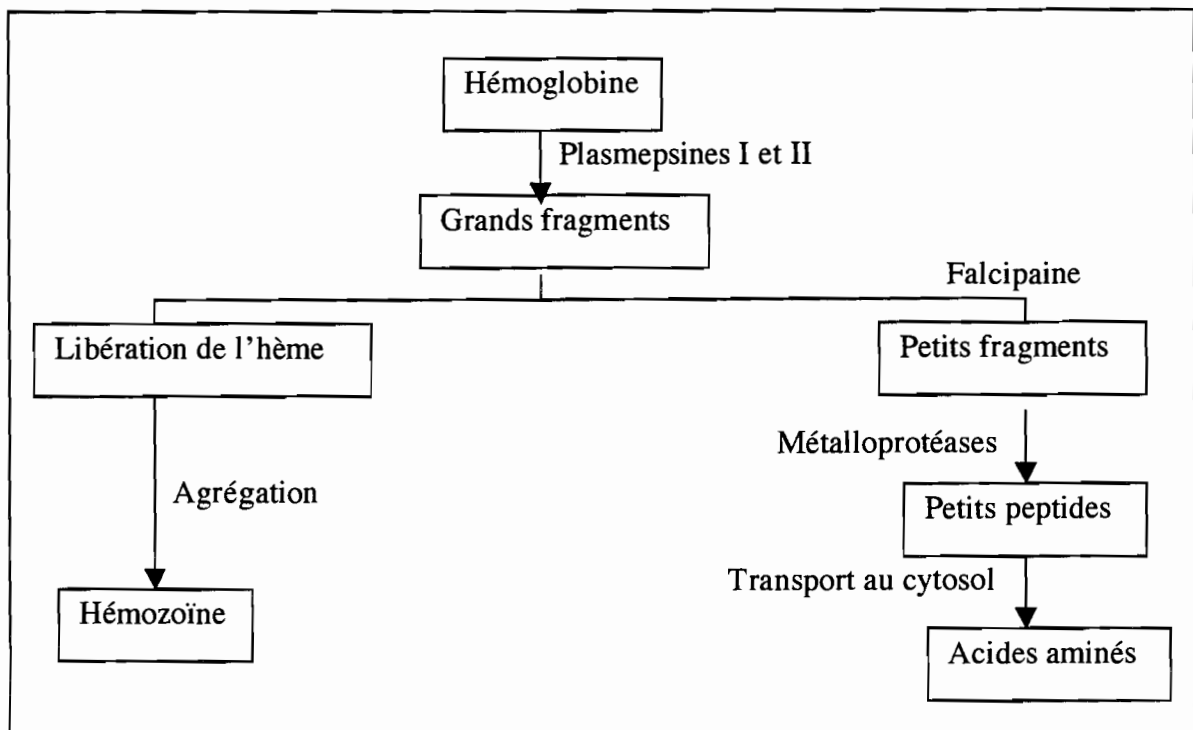


FIGURE # 13. La voie catabolique de la dégradation de l'hémoglobine à l'intérieur de la vacuole digestive du parasite.

B. Formation de l'hémozoïne

Les recherches ont proposé quatre agents qui pourraient causer l'agrégation de l'hème: une hème polymérase, la biocristallisation de l'hème, un processus facilité par les lipides et une protéine responsable de la nucléation. En 1992, Slater et Cerami ont reporté que l'extrait de trophozoïtes de *P. falciparum* pouvait polymériser l'hème monomérique en une relation dépendant de la concentration de la protéine, du temps et du pH. Cette activité attribuée à une "hème polymérase" a été reportée comme sensible à la chaleur, à l'action de dénaturation par des surfactants comme le SDS et à l'activité de certains antipaludiques [Ziegler et al., 2001]. Chou et Fitch ont obtenu des résultats semblables [Chou et al., 1992]. Cependant, en 1995, Dorn et al. n'ont pas retrouvé la sensibilité de l'hème polymérase à la chaleur et ils ont montré que l'activité de polymérisation de l'hème n'est pas un processus enzymatique mais un processus

chimique [Dorn et al., 1995]. Ils ont montré que l'hémozoïne pouvait être générée à partir d'hémozoïne purifiée ou de synthèse. En 1998, Dorn et al. ont confirmé l'efficacité des lipides pour polymériser l'hème. Ils ont montré qu'un extrait de trophozoites obtenu par extraction par l'acétonitrile et additionné de plusieurs types de lipides, était capable d'initier la formation de l'hémozoïne [Dorn et al., 1998]. En plus Dorn a montré que l'initiation de la polymérisation de l'hème peut être spontanée sans hémozoïne préformée. Parallèlement à ces travaux, Sullivan et al. ont identifié deux protéines riches en histidine, HRP-II et HRPIII, lesquelles facilitent la formation de l'hémozoïne [Sullivan et al., 1996a]. Plusieurs groupes de recherche ont suggéré que les HPRs pouvaient participer à la nucléation de l'hémozoïne. La structure tridimensionnelle de la protéine donne une surface préorganisée et fonctionnalisée qui peut servir à organiser la nucléation [Ziegler et al., 2001].

C. Propriétés de l'Hémozoïne

Depuis le premier isolement de l'hémozoïne effectué en 1891, la composition du pigment a beaucoup varié [Fitch et al., 1987]. La dernière composition de l'hémozoïne proposée par Slater est identique à la ferriprotoporphyrine IX. Elle a été caractérisée par des études d'IR, de spectroscopie des Rayons X, d'analyse élémentaire et grâce à la chimie de synthèse [Slater et al., 1991].

Le modèle de la structure de l'hémozoïne qui a duré le plus longtemps est celui du polymère de coordination de Fe(III)PPIX. Dans ce modèle, l'un des oxygènes d'un des groupes propionates d'une unité, forme une liaison axiale avec l'ion ferrique de coordination cinq d'une autre unité (Figure # 14 -a) [Slater et al., 1991]. La liaison Fe-O (propionate) a été confirmée par les études de IR et de spectroscopies Raman. En plus, la spectroscopie fine d'absorption de Rayon X montre la présence d'un atome de fer de

coordination cinq lié à quatre azotes porphyriniques et à un oxygène monodentate axial qui génère la liaison Fe-O (propionate) avec une distance de 1.90 Å [Slater et al., 1991]. Grâce à l'irradiation par un synchrotron de haute résolution, Bohle et ses collègues ont proposé une variation de la coordination linéaire du polymère de l'hème. Ils ont introduit des dimérisations propioniques avec des ponts d'hydrogènes sur les polymères (Figure # 14.-b) [Bohle et al., 1997]. Finalement, la structure correcte de l'hémozoïne se présente comme une unité dimérique liée par des liaisons réciproques fer- carboxylate présents sur les chaînes propioniques terminales de chaque porphyrine. En plus, les dimères de Fe(III)PPIX sont liés avec des ponts d'hydrogènes sur des chaînes qui forment un réseau cristallin étendu (Figure # 14-c) [Pagola et al., 2000]. La Figure # 14 montre les trois représentations de la structure de l'hémozoïne:

- Le modèle proposé par les études spectroscopiques: l'hémozoïne est un polymère linéaire où des unités d'hème sont liées par une liaison propionate [Slater et al., 1991; Fitch et al., 1987]; (Figure # 14. a).
- Le modèle proposé par les données de diffraction de rayon X où deux brins d'unités d'hème sont liés par des ponts d'hydrogènes à travers un autre groupe d'acide propionique [Bohle et al., 1997], (Figure # 14. b).
- Le modèle actuel qui se présente sous la forme d'un réseau de ponts d'hydrogènes de dimères d'hème liés par des liaisons propionates qui sont réciproques et axiales [Pagola et al., 2000], (Figure # 14. c). Dans cette représentation, la paire dimérique montre une distance Fe-O (du propionate) de 1.86 Å, l'atome central de fer est à 0.4 Å au-dessus du plan moyen défini par les noyaux pyrroliques. La distance O-O pour les groupes propioniques liés par des ponts d'hydrogènes est de 2.60- 2.70 Å [Pagola et al., 2000].

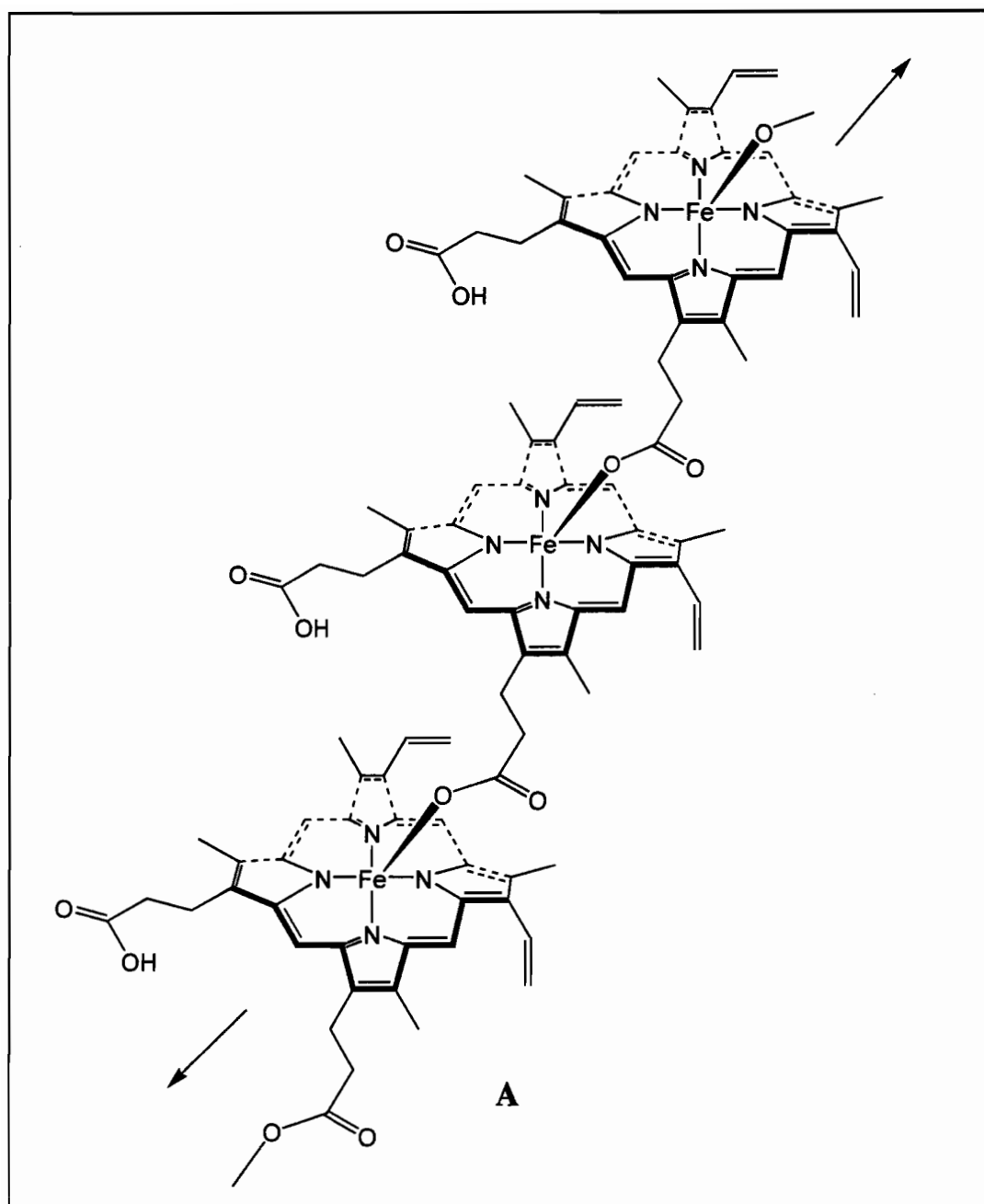


FIGURE # 14. Structures de l'hémozoïne. a) Modèle dérivé des études spectroscopiques

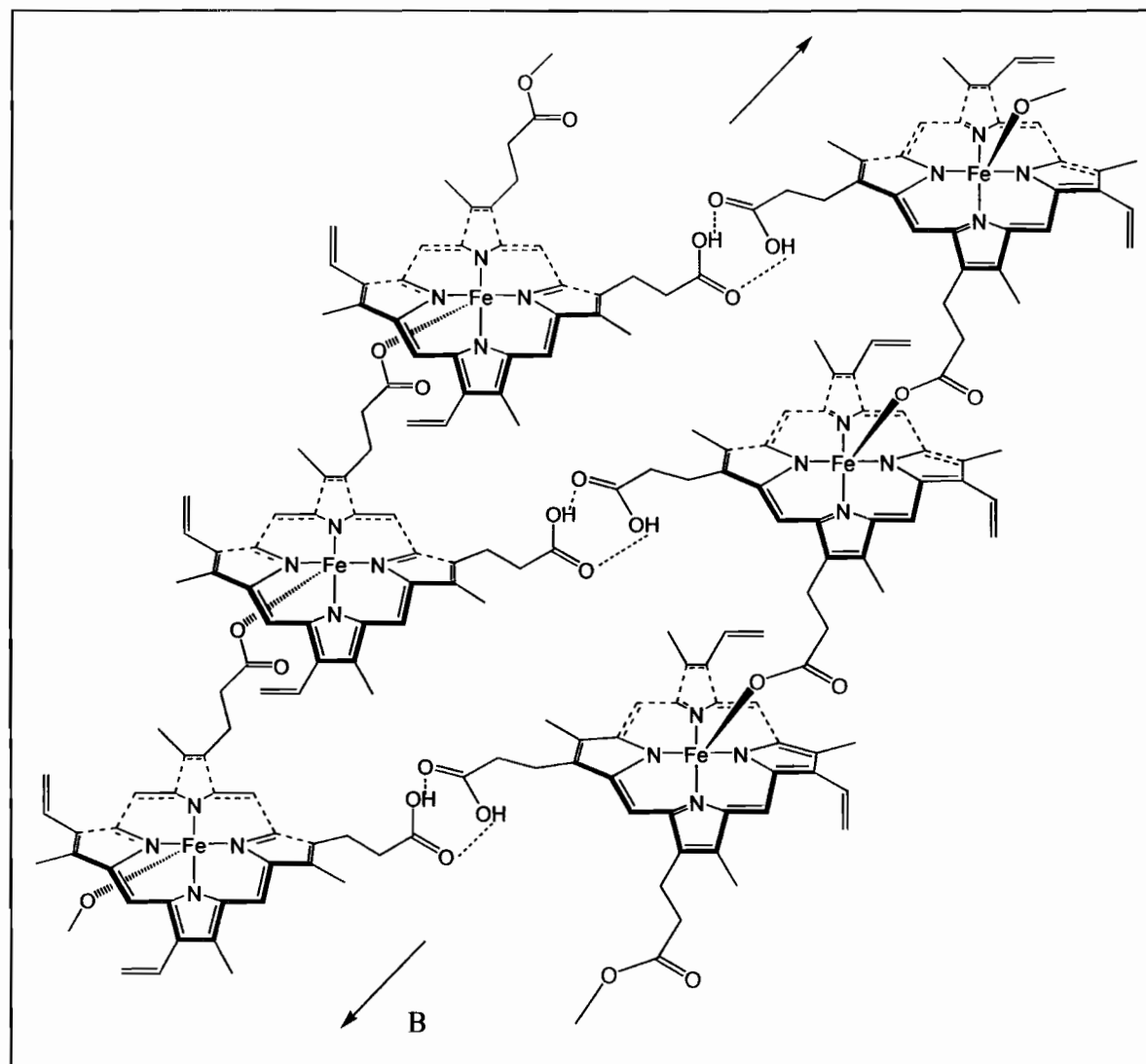


FIGURE # 14. Suite. Structures de l'hémozoïne. b) Modèle dérivé des études de diffraction de Rayon- X.

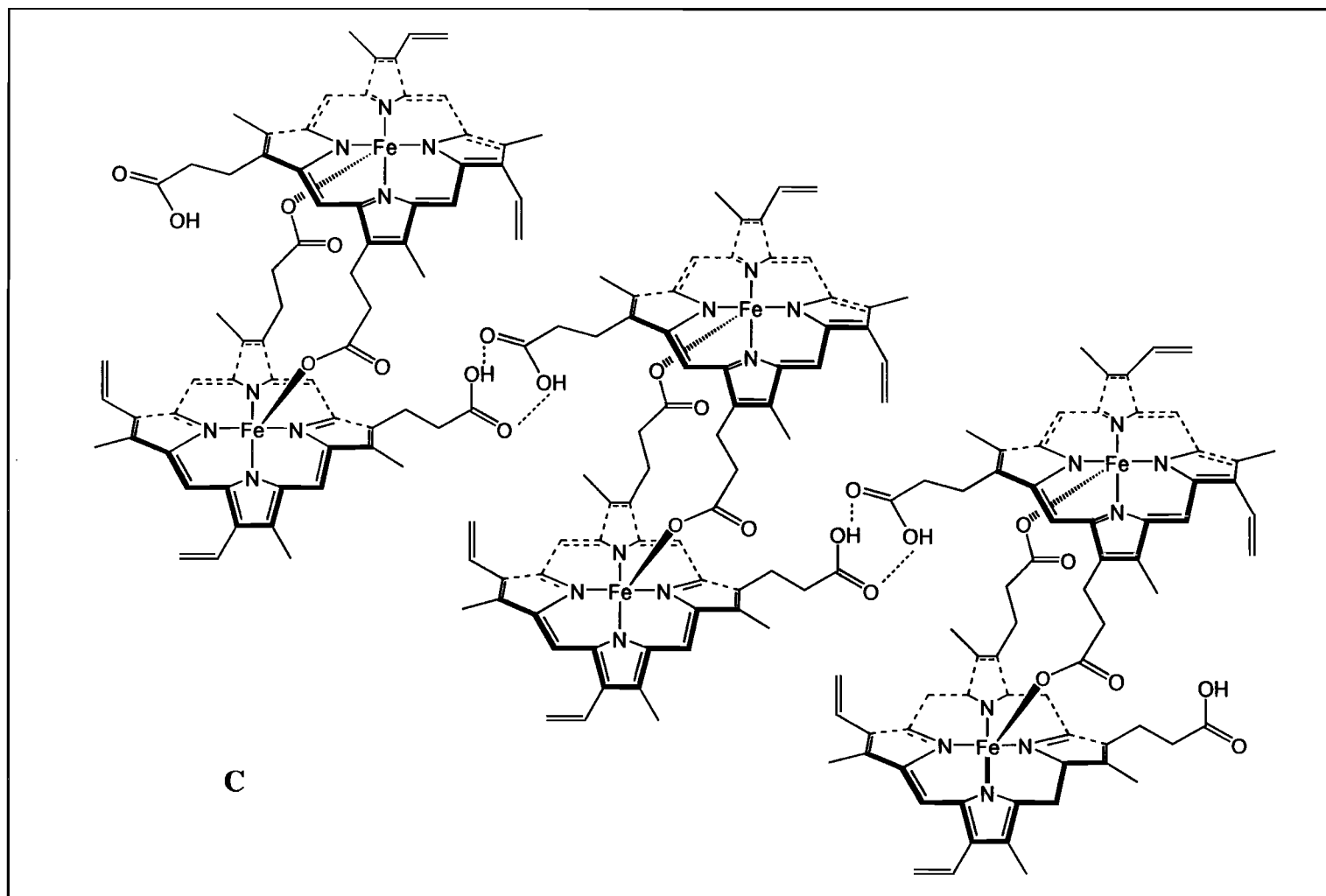


FIGURE # 14. Suite. Structures de l'hémozoïne. c) Modèle actuel dérivé des études de Rayon- X.

D. Inhibition de l'Agrégation de l'Hème -Essais

La concentration de l'hème à l'intérieur de la vacuole digestive peut atteindre 400mM [Goldberg et al., 1990]. À cette concentration, l'hème peut interrompre les fonctions métaboliques du parasite. Ces perturbations métaboliques sont dues à la peroxydation des membranes [Green et al., 1996], l'inhibition des enzymes [Gluzman et al., 1994;] et la génération de radicaux libres oxydants [Atama, 1993]. Pour éviter sa destruction, le parasite transforme l'hème toxique en hémozoïne, un cristal non toxique pour le parasite.

Un grand nombre d'essais ont été réalisés pour mesurer l'inhibition de l'agrégation de l'hème *in vitro* [Dorn et al., 1995; Dorn et al., 1998; Sullivan et al., 1996a; Ignatushchenko et al., 1997, Ziegler et al., 2001]. Le principe des essais est l'incubation de l'hème (10- 500 μ M) en présence d'un témoin positif d'agrégation dans un tampon d'acétate ou phosphate (50 mM-500 mM) à un pH entre 4.5 et 5.5 durant 12-48 heures à 37 °C. Parmi les témoins d'agrégation, on peut citer: un extrait de trophozoïtes (25- 500 μ g de protéine), un extrait de la vacuole digestive, un cristal synthétique d'hémozoïne (2- 10 μ g/ml), un cristal synthétique d'hémozoïne marquée isotopiquement avec du [14 C], des protéines riches en histidine (2- 6 nmole). Après l'incubation, l'agrégat résultant de la polymérisation de l'hème est soumis à une série de lavages en utilisant du SDS, de l'eau, du DMSO et du bicarbonate de sodium (pH 9.1) ou du tris-HCl (pH 7.5). Le matériel insoluble restant, c'est-à-dire l'hémozoïne, est caractérisé par FT- IR.

Un autre essai proposé, appelé aussi essai en tube, est l'essai de la synthèse chimique de la β -hématine. Une solution de substrat d'hème est préparée avec ou sans

inhibiteur dans 0.1 M de NaOH. Le substrat est introduit dans un mélange de réaction pré - équilibré avec un tampon acétate (60°C, concentration finale de 4.5 M). Le milieu réactionnel est agité pendant 10 à 30 minutes, il est ensuite refroidi et filtré. Le précipité est lavé avec de l'eau et il est séché sur gel de silice ou P_2O_5 [Egan et al., 1994; Egan et al., 1999]. Le mélange sec obtenu après réaction est analysé par FT- IR, par sa solubilité dans du carbonate de sodium à 0.1 M (pH 9.1), par analyse élémentaire et par diffraction des rayons X [Egan et al., 1999, Slater et al., 1991].

E. Inhibiteurs de l'agréation de l'hème et leurs mécanismes d'action.

Parmi les composés qui inhibent la formation de l'hémozoïne, on peut distinguer quatre familles: les quinoléines, les hydroxyxanthones, les composés de type N_4O_2 ou bases de Schiff (composés métalliques), les porphyrines et les métalloporphyrines

Il y a des évidences qui suggèrent que le mode d'action de la chloroquine et des autres amino-4-quinoléines est l'interruption du processus de détoxification de l'hème libre généré pendant le catabolisme de l'hémoglobine [Ridley et al., 1997]. Chou et Fitch ont démontré que les amino-4-quinoléines et non pas les quinoléines méthanolés inhibent la formation de l'hémozoïne dans un essai *in vivo* [Chou et al., 1993].

La relation précise entre la structure du composé et son activité est difficile à établir car deux conditions doivent être remplies:

- Les inhibiteurs de la polymérisation de l'hème doivent interrompre le processus de la formation de l'hémozoïne
- Ils doivent se concentrer dans la zone de concentration de l'hème, la vacuole digestive.

Ridley a montré que l'existence de groupes terminaux de dialkylaminoalkylamino sur les amino-4-quinoléines sont importants pour ces activités. En plus, la substitution par un chlore sur le C- 7 ou C- 6 est fondamentale pour obtenir une activité maximale [Ridley et al., 1996]. Une des premières hypothèses du mécanisme d'action pharmacologique de la chloroquine (33) a été attribuée à son affinité avec le Fe(III)PPIX. La chloroquine et les autres composés quinoléiques s'accumulent dans la vacuole digestive où ils forment un complexe hème - composé. Ce complexe empêche la séquestration de l'hème et permet aux niveaux d'hème nuisible de s'élever jusqu'à arriver à la lyse. Cependant, il n'y a pas une relation entre les constantes d'équilibre des complexes hème - composé et leurs efficacités comme inhibiteurs de l'hème *in vitro*. Ils ont également proposé que le mécanisme de la résistance à la chloroquine soit lié à l'accroissement du pH dans la vacuole qui a une influence sur le devenir de l'hème [Slater, 1993]. Trois années plus tard, Sullivan et ses collaborateurs ont proposé que:

- * La chloroquine (33) forme tout d'abord un complexe avec l'hème
- * Le complexe est ensuite incorporé à la chaîne en agrandissant l'hémozoïne.

Cette proposition a été présentée grâce à des données d'autoradiographie en microscopie électronique [Sullivan et al., 1996b]. Cependant, une proposition précédente fait par Constantinidis suggère que la surface du pigment malarique est un empilement de Fe(III)PPIXs lequel donne une large région dense en électrons π qui peut interagir avec un excès de quinoléines. Grâce à l'addition d'hème libre, il est possible d'obtenir la formation d'un complexe quinoléine - hème avec une relation de 1:2 pour la quinoléine capturée [Constantinidis et al., 1988a; Constantinidis et al., 1988b]. Par conséquent, l'hème s'accumule et il interrompt la fonction métabolique via la peroxydation des membranes, l'inhibition des enzymes et la génération de radicaux

libres oxydatifs. Sullivan a proposé que la liaison entre le complexe de quinoléine - hème et l'hémozoïne soit spécifique, saturable et que diverses quinoléines puissent être en compétition pour cette liaison. En conséquence, un composé qui inhibe la polymérisation du hème doit former un complexe avec l'hème et ce complexe doit se lier au polymère de l'hème. [Sullivan et al., 1998]. La relation entre l'activité des composés antipaludiques, leur accumulation et l'inhibition de la polymérisation de l'hème ont été étudiées par Hawley et ses collaborateurs [Hawley et al., 1998]. Ses travaux ont démontré que seuls les composés similaires structuralement aux quinoléines inhibent la polymérisation de hème à une faible concentration (15- 100 μ M). Cependant, ils ont montré qu'il n'y avait pas une corrélation entre l'inhibition de la polymérisation de l'hème et la CI_{50} d'inhibition de la schizogonie érythrocytaire par les composés. Ils ont conclu que l'activité des composés du type de la quinine dépendait non seulement de leur habilité à inhiber la polymérisation de l'hème mais aussi de leur accumulation significative dans la vacuole digestive. Ses résultats montrent l'importance du processus dynamique de bio transport, qui est nécessaire pour mettre au point un inhibiteur effectif de la polymérisation de l'hème. Les composés les plus efficaces sont ceux que se concentrent à des niveaux très élevés dans la vacuole digestive. Les composés les plus puissants sont la chloroquine (33) et l'amodiaquine (41) que s'accumulent à des niveaux millimolaires dans la vacuole digestive. Parmi les antipaludiques du type quinoléique, on peut citer également la quinine (1), et la pyronaridine (44).

Un autre type de composés qui a été reporté par son efficacité contre des souches multi-résistantes sont des produits possédant une propriété oxydante. Ces composés augmentent la production de radicaux oxygénés dans les érythrocytes parasités où ils augmentent la susceptibilité de ces cellules aux radicaux oxygénés. Ce type de

composés est représenté par l'artémisinine (22) [Hong et al., 1994], le bleu de méthylène (30) [Atamna et al., 1996], l'exifone (58) [Winter et al., 1996], le rufigallol (59) [Winter et al., 1996] et la 2, 3, 4, 5, 6 – pentahydroxyanthone aussi connu comme le composé X5 (60) [Ignatushchenko et al., 1997]. Ces trois derniers composés sont présentés dans la Figure # 15. Comme il a été proposé pour les composés du type quinoléine, le X5 forme un complexe soluble avec les monomères ou avec les oligomères de l'hème [Ignatushchenko et al., 1997]. L'activité inhibitrice de ce composé est présente quand les positions 4 et 5 sont hydroxylées. Cette activité augmente quand il y a un plus grand degré d'hydroxylation. Le modèle proposé pour le complexe hème-composé présente trois interactions:

- entre le fer de l'hème et l'oxygène du carbonyle,
- entre les deux anneaux aromatiques plans,
- entre les groupes propionates de l'hème et les hydroxyles de la xanthone dans les positions 4 et 5.

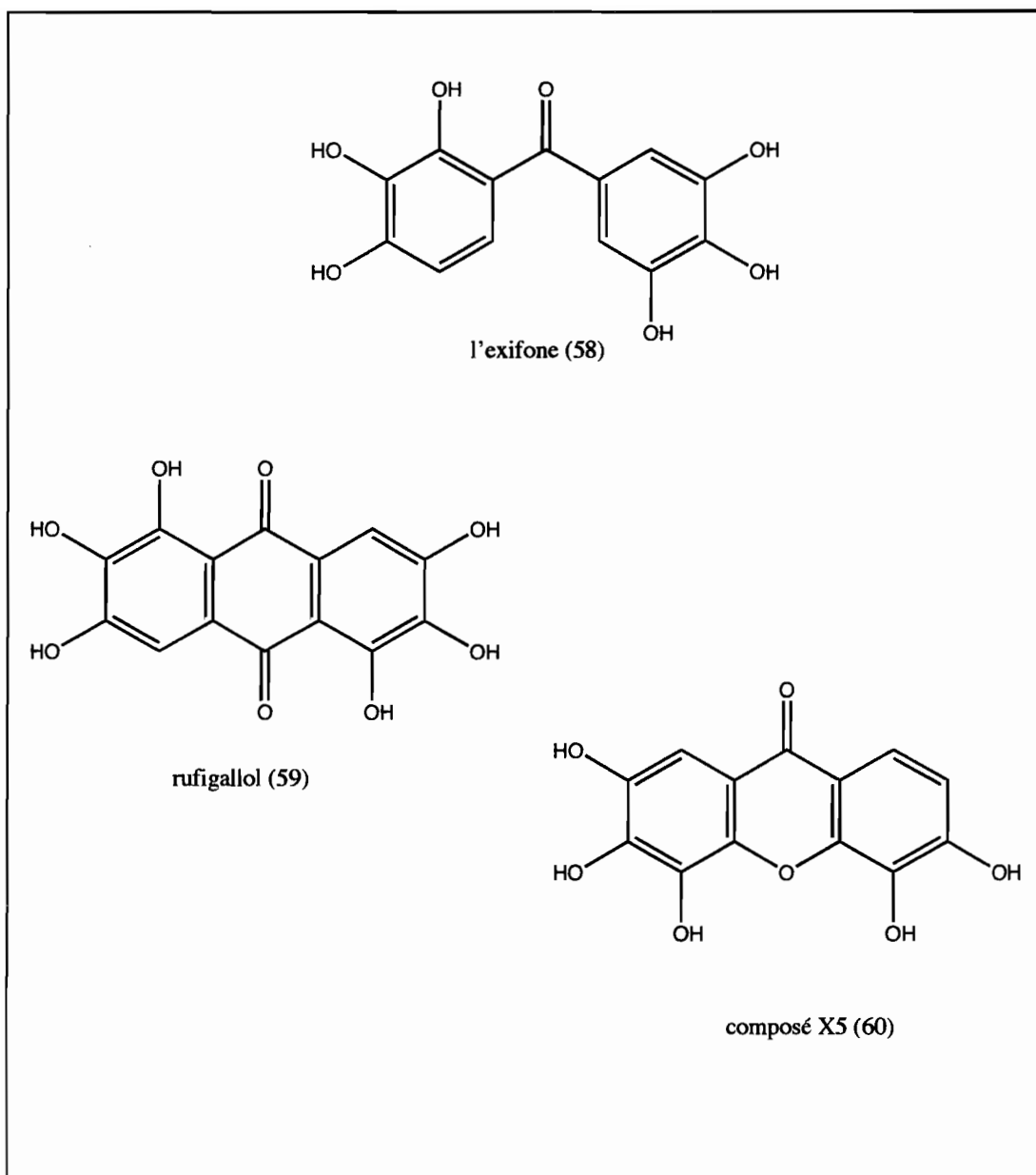


FIGURE # 15. Composés qui inhibent la formation de l'hémozoïne.

Un autre type de composants inhibiteurs de la formation de l'hémozoïne sont ceux dont la structure est en relation avec la structure du substrat. Ceux-là sont les complexes des porphyrines et des métalloporphyrines. La Figure # 16 présente quelques porphyrines et porphyrines métalliques avec une activité antipaludique. En 1997, Basilico et ses collaborateurs démontrèrent que les porphyrines sans métal, comme la protoporphyrine IX et l'hématoporphyrine, étaient capables d'inhiber l'agrégation de la β -hématine de manière dose dépendante. En utilisant l'essai d'agrégation de Egan et al. (1994), des études de solubilité différentielle et la spectroscopie de IR-FT révélèrent que l'inhibition complète de l'agrégation de l'hème se produit dans un relation quantitative hème: protoporphyrine IX de 1 à 3 et pour hème: hématoporphyrine de 1 à 0.5. Les auteurs suggèrent que l'inhibition est le résultat de l'empilement π - π des porphyrines sans métal et de l'hème. De plus, l'accroissement de l'effectivité de l'hématoporphyrine sur la protoporphyrine IX a été attribué à des coordinations de l'hydroxyle au fer de l'hème [Basilico et al., 1997]. Par la suite, en 1999, Monti et al. présentèrent un nouvel inhibiteur du processus de l'agrégation de l'hème, le Fe(II)PPIX. Ce complexe, produit chimiquement ou électroniquement, inhibe la formation de l'hémozoïne via un mécanisme auto-oxydatif. De plus, Fe(II)PPIX ne se polymérise pas et sa formation est favorisée par la cinétique de réaction à partir de la réduction de la Fe(III)PPIX par rapport à la polymérisation de Fe(III)PPIX. Le complexe inhibé est formé par un Fe(II)PPIX central couvert par deux unités de Fe(III)PPIX unis par deux ponts hydroxo axiales. Ce trimère linéaire est probablement stabilisé par des interactions π - π coplanaires. Finalement, Monti propose l'existence de deux réactions en compétition dans la vacuole digestive. Ces réactions sont la réduction de Fe(III)PPIX par les thiols et l'oxydation des thiols par l'oxygène catalysé par le fer de l'hème. Les agents de réduction, comme les thiols, inhiberaient la polymérisation de l'hème et augmenteraient

la génération de radicaux hydroxyles et peroxydes d'hydrogène, qui aurait comme conséquence la peroxydation des lipides [Monti et al., 1999]. La même année, Cole et ses collaborateurs montrèrent que le métal central des porphyrines métalliques joue un rôle très important dans l'inhibition de la formation de la β -hématine. Ces études conclurent que les complexes de Mg(II)PPIX, Zn(II)PPIX, Sn(IV)PPIX, Cu(II)PPIX, Mn(III)PPIX, Co(III)PPIX et Cr(III)PPIX réalisent l'inhibition mentionnée [Ziegler et al., 2001]. Ils ont suggéré deux modes d'inhibition qui sont en relation étroite avec l'inhibition de la formation de la β -hématine. Le premier est la vitesse d'échange de l'eau pour former des complexes hydratés sous forme d'octaèdre avec l'ion métallique central de la protoporphyrine métallique. Le second mode d'inhibition est en relation avec la solubilité relative des porphyrines métalliques dans les conditions expérimentales utilisées. Ils ont indiqué que les protoporphyrines métalliques forment un adduit π - π au substrat (hème). Pour compléter cette liaison, ils ont observé 2 modes différents d'union. Les complexes de Mg(II)PPIX, Zn(II)PPIX y Sn(IV)PPIX, qui sont les inhibiteurs les plus forts, n'évitent pas complètement la formation de l'union Fe-O (propionate). Au contraire, les complexes Co(III)PPIX, Cr(III)PPIX et Mn(III)PPIX, qui sont des inhibiteurs moins effectifs, préviennent apparemment la formation de la dite liaison. Une interprétation possible de ces observations est que les liaisons Fe-O (propionate) pourraient ne pas être responsables de l'interaction oligomérisante prédominante à l'intérieur de la β -hématine sinon celles provenant des stabilisateurs moyennant des ponts d'hydrogène.

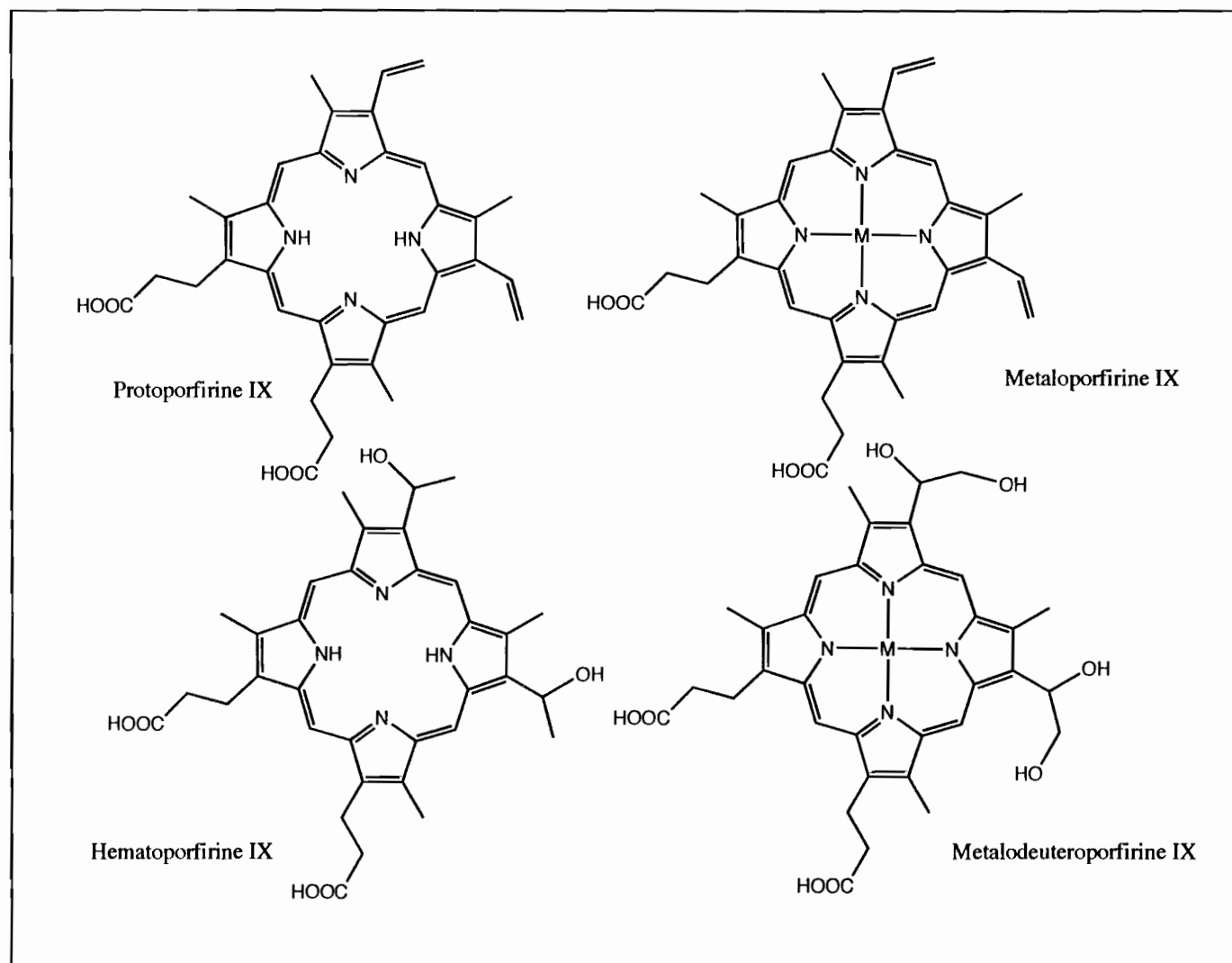


FIGURE # 16. Porphyrines et métalloporphyrines présentant des activités antipaludiques.

2. Le paludisme en Bolivie et la recherche d'antipaludiques.

A. Les caractéristiques géographiques et climatiques de la Bolivie.

La Bolivie est située au centre de l'Amérique de Sud avec une superficie de 1 098 581 Km². Le pays s'étend de la cordillère des Andes jusqu'aux bassins de l'Amazone et du Paraguay. Il se caractérise par l'important contraste géographique entre les cordillères andines qui occupent le secteur occidental et la région orientale basse et humide. Les Andes boliviennes se divisent en deux cordillères, la Cordillère Occidentale ou Volcanique à l'Ouest et la Cordillère Orientale ou Real à l'Est. Entre les deux cordillères se trouve le haut plateau (4 000 m). La surface de la région andine est de 100 000 Km². Elle est très aride, venteuse, et froide. Dans la cordillère Orientale, on peut trouver plusieurs vallées de moyenne altitude aux climats plus favorables. La région d'orient occupe presque deux tiers du territoire national et elle est formée de plaines et de bas plateaux. Cette région est couverte par une épaisse végétation due au climat chaud et humide. La région de transition entre la Cordillère Orientale et les plaines orientales correspond à une série de vallées appelées "Los Yungas". Ces vallées sont couvertes de forêts tropicales.

La Bolivie est un pays qui présente une grande variation altitudinale. Dans la région andine, on peut trouver des pics très élevés comme l'Illampu qui culmine à 7014 m d'altitude, alors que dans l'orient, on trouve des plaines à 200 m d'altitude. Les différents écosystèmes présents sur les hauts plateaux, dans les vallées sèches, les forêts tropicales, le désert, le Chaco (équivalent de la Pampa argentine) du à des conditions

climatiques et altitudinales variées favorisent une grande biodiversité de la flore bolivienne.

B.Persistance du paludisme en Bolivie.

En Bolivie, des maladies parasitaires affectent la population de façon considérable, spécialement la leishmaniose, la maladie de Chagas et le paludisme. Le paludisme affecte une grande partie de la population vivant dans des zones aux conditions climatiques appropriées et ces populations sont peu protégées du fait de la carence en programmes de lutte et de prévention. Plus de trois millions de personnes soit plus d'un tiers de la population bolivienne sont exposées à cette maladie. Une étude épidémiologique récente montre une hausse spectaculaire de cas passant de 9 774 en 1981 à 46 911 en 1995 et à 86 213 en 1998. La région endémique de la Bolivie couvre une superficie de 821 346 Km² (75% de la superficie du pays) et correspond à une zone de températures élevées. Dans ces régions de l'Amazonie, de l'Orient et du Chaco bolivien, autant le vecteur (le moustique *Anopheles darlingi*) comme les parasites (*Plasmodium falciparum* et *P. vivax*) trouvent les conditions climatiques et environnementales favorables pour une transmission persistante toute l'année [Muñoz et al., 2000]. Ces régions correspondent à 4 départements en Bolivie : le département de La Paz, avec les provinces de Nord Yungas et Sud Yungas, le département du Pando avec les provinces de Manunpí, Madre de Dios et Général Roman, le département de Santa Cruz avec la province Luis Calvo et finalement, dans le département de Tarija: le Gran Chaco. Il est également possible de trouver quelques foyers de paludisme dans les départements de Cochabamba, Potosi et Chuquisaca [Ministère de Prévention Sociale, 1992].

Dans les 100 dernières années, la Bolivie a subi trois étapes d'accroissement du paludisme. Ces étapes correspondent précisément à des époques de guerres, à la carence

de programmes pour lutter contre ce fléau et à des changements climatiques. Comme il a été indiqué dans la Partie I de ce travail, ces trois causes sont favorables à l'apparition et à la propagation de la malaria. La lutte contre le paludisme en Bolivie commença en 1920 avec la tentative d'éradication du moustique par des insecticides et avec un traitement antipaludique à base de quinine. Douze années plus tard, survint la première crise concernant le contrôle de la malaria. En 1932, il se produit la dissémination de la maladie dans tout le pays, due à la guerre du Chaco. Cette guerre non seulement freina les programmes de lutte, mais elle provoqua de grands mouvements humains vers et depuis la zone endémique du Chaco [Mendez, 1981]. Les 40 années suivantes, on effectua divers programmes de lutte grâce à la participation d'organismes internationaux et l'épidémie fut contrôlée. Cependant, lorsque ces programmes durent être financés par le gouvernement bolivien, le nombre de cas augmenta d'année en année, atteignant un pic maximum en 1978 [Mendez, 1982]. La situation épidémique la plus critique enregistrée dans le pays dans les 50 dernières années, apparue en 1998. Elle est due aux changements climatiques causés par le phénomène du "Niño" (nombreuses précipitations dans des zones habituellement arides). À partir de 1999, le nombre de cas a baissé, mais cela ne signifie pas que la maladie ait disparu compte tenu du nombre de cas enregistrés en 2003 (50 402) [S.N.I.S., 2005]. Faute de programmes adéquats de contrôle et lutte, une des conséquences est le développement de la résistance aux antipaludiques administrés qui est due à l'apparition de "l'automédication" qui se traduit par un traitement inadéquat, non suivi jusqu'à la fin de la prescription ou à des doses inadéquates. La Figure # 17 montre la carte de distribution et d'amplitude du paludisme en Bolivie. Il est important d'indiquer que des deux espèces de *Plasmodium* qui cohabitent en Bolivie, *P. falciparum*, responsable des cas les plus sévères de malaria, produit 7,2% des cas; alors que *P. vivax* est responsable du reste, à savoir 92,8% des cas

[Muñoz et al., 2000]. Le Tableau # 6 présente les cas de paludisme par départements en Bolivie [S.N.I.S., 2005].

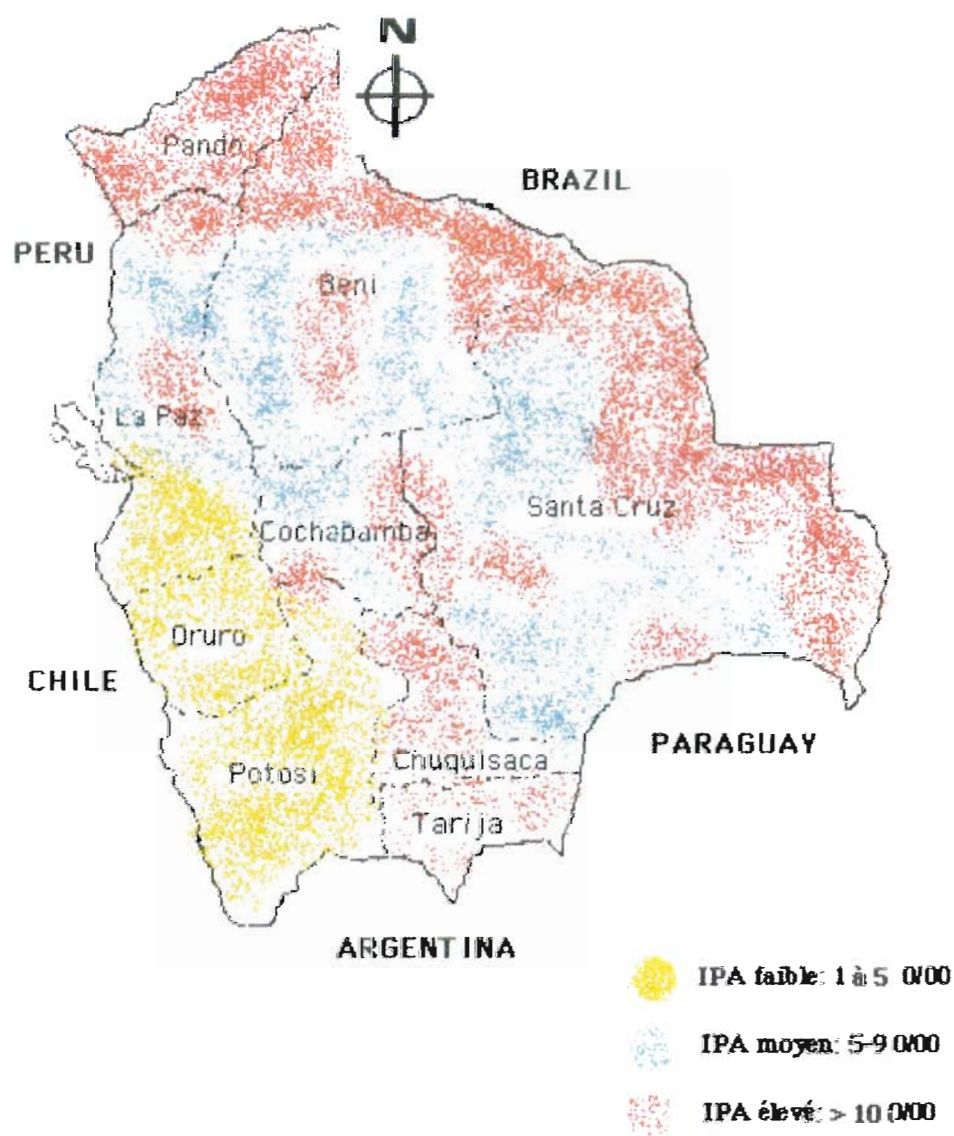


FIGURE # 17. Carte de distribution et d'amplitude du paludisme en Bolivie.

Département	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Beni	15585	26370	42652	12611	8562	6369	11758	30409	28549
Chuquisaca	6286	6945	11669	6117	8272	4753	3275	2414	7071
Cochabamba	1530	3482	3564	1114	2553	2187	1273	667	1034
La Paz	4152	6609	8670	2755	2410	2835	3660	3423	2965
Oruro	1	0	0	0	0	1	2	30	2
Pando	1530	1585	4628	1319	2545	2326	1396	828	2219
Potosí	1165	1384	4671	1400	1020	643	363	177	275
Santa Cruz	8149	5945	5569	2421	8338	4526	2840	2892	1824
Tarija	17098	5484	4790	2687	3929	1099	729	9562	2762
TOTAL	55504	57804	86213	30424	37629	24739	25296	50402	46701

TABLEAU # 6. Nombre de cas de paludisme (*Plasmodium vivax*) par département en Bolivie.

C. La Bolivie et la recherche antipaludique

La recherche des composés antipaludiques en Bolivie est à la charge des universités et des organismes internationaux. Parmi ces institutions, nous devons souligner la participation de l'Université Mayor de San Andrés (UMSA) à La Paz et de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD; ex-ORSTOM) dépendant du gouvernement français. Un des premiers travaux consacré à la recherche de substances naturelles antipaludiques donna comme résultat la caractérisation du n-hentriacontanol [Deharo et al.; 1992]. Quelques années après un programme de recherche de composants naturels bio-actifs a permis l'évaluation de plantes médicinales provenant de différentes zones de la Bolivie. Ces plantes ont été sélectionnées suivant des critères ethno-pharmacologiques. Grâce aux essais biologiques qui furent réalisés, on a pu valider l'usage médicinal antipaludique de plusieurs de ces plantes. Environ 150 espèces furent testées et l'on enregistra 20 espèces prometteuses. Le Tableau # 7 présente quelques-unes des espèces actives contre *Plasmodium in vitro* et *in vivo*. Dans ce tableau, on indique également l'usage traditionnel de chacune de ces plantes. *Bowdichia virgilioides* (Fabaceae) est l'une des plantes les plus intéressantes avec une activité importante autant *in vitro* qu'*in vivo* [Deharo et al.; 2001]. Une autre plante active dans les deux essais a été *Geissospermum laeve* (Apocynaceae), cependant celle-ci est toxique *in vivo* à des concentrations supérieures à 100 mg/Kg. Les deux espèces sont considérées comme étant de puissants antipaludiques très utilisés dans les médecines traditionnelles amérindiennes. Des espèces utilisées pour soulager d'autres types de maladies (diarrhée ou vomissement ou lésions buccales), donnèrent des résultats significatifs. Parmi celles-ci, on peut citer *Tanaecium jaroiba* et *Sclerolobium aff. guianense*. Finalement, on obtint d'intéressants résultats contre *P. falciparum in*

vitro avec deux espèces utilisées pour des fins non médicinales. Celles-ci sont *Guatteria aff. schomburgkiana* et *Derris amazonica* [Muñoz et al.; 2000].

FAMILLE	ESPECES	IC ₅₀ [μg/ml] F32	IC ₅₀ [μg/ml] INDO	Dose ¹	<i>P. vinckei</i> % inhibition	Dose ¹	<i>P. berghei</i> % inhibition	Usage traditionnel
<i>Annonaceae</i>	<i>Guatteria aff. schomburgkiana</i> Mart. ² (E) ³	19	4			> 500	36	Construction
<i>Apocynaceae</i>	<i>Geissospermum laeve</i> Miers ² (E) ³	3.1	2	50	41	100 50	Toxique 36	Antipaludique, vomissements, douleur au foie
<i>Bignoniaceae</i>	<i>Tanaecium jaroba</i> Sw. ² (E) ³	20	20	250	78	250	70	Diarrhées, vomissements,
<i>Burseraceae</i>	<i>Protium giabrescens</i> Swart. ⁴ (E) ³	> 100				> 100	61	Céphalées, analgésiques, inflammation oculaire, brûlures, rhumatismes
<i>Fabaceae</i>	<i>Apuleia leiocarpa</i> Macbr. ² (E) ³	50	50			250 100	53 31	Fièvre
<i>Fabaceae</i>	<i>Bauhiana guianensis</i> Aublet ² (E) ³	> 100	28	250 50	Toxique 84			Diarrhée, douleur d'estomac
<i>Fabaceae</i>	<i>Sclerolobium aff. guianense</i> B. ² (E) ³	10	10	200	82			Gale

¹: Dose: [en mg/kg/4 jours]

²: Muñoz et al.; 2000

³: E: Écorce

⁴: Deharo et al.; 2001

TABEAU # 7. Espèces boliviennes actives contre *Plasmodium in vitro et in vivo*.

FAMILLE	ESPECES	IC ₅₀ [μg/ml] F32	IC ₅₀ [μg/ml] INDO	Dose ¹	<i>P. vinckei</i> % inhibition	Dose ¹	<i>P. berghei</i> % inhibition	Usage traditionnel
<i>Fabaceae</i>	<i>Pterocarpus</i> aff. <i>amazonum</i> (B.) Amsh. ² (E) ³	> 100	> 100	250	98			Cicatrisant de brûlures
<i>Fabaceae</i>	<i>Bowdichia virgi-</i> <i>lioides</i> Kunth ⁴ (E) ³	1				100	51	Leishmaniose, dysenterie, malaria
<i>Fabaceae</i>	<i>Derris amazonica</i> Killip ² (T,F) ³	3.2	18					Venin pour poissons
<i>Hernandiaceae</i>	<i>Sparattanthelium</i> <i>amazonum</i> M. ² (E) ³	2	2	250	57	250	Toxique	Diarrhée, douleur d'estomac, vomissements
<i>Lauraceae</i>	<i>Nectandra</i> <i>cuspidata</i> Nees ² (E) ³	> 100	> 100	250	83	250	61	Douleur d'estomac

¹: Dose: [en mg/kg/4 jours]

²: Muñoz et al.; 2000

³: E: Écorce; T: Tige; F; Feuille

⁴: Deharo et al.; 2001

TABLEAU # 7. Suite. Espèces boliviennes actives contre *Plasmodium in vitro et in vivo*.

FAMILLE	ESPECES	IC ₅₀ [μ g/ml] F32	IC ₅₀ [μ g/ml] INDO	Dose ¹	<i>P. vinckei</i> % inhibition	Dose ¹	<i>P. berghei</i> % inhibition	Usage traditionnel
<i>Lauraceae</i>	<i>Nectandra</i> aff. <i>hihua</i> (Ruíz & Pavón) R. ⁴ (E) ³	4.7				500 100	Toxique -	Construction, bois pour le feu
<i>Lauraceae</i>	<i>Licaria canelia</i> (M.) Kostermans ⁴ (E) ³	3.8				250 100	Toxique -	Douleur d'estomac, spasmes intestinaux
<i>Moraceae</i>	<i>Maquira coriacea</i> (K.) C.C. Berg. ² (E) ³	50	9	250 100	Toxique 92			Malaria et fièvre
<i>Myristica- ceae</i>	<i>Iryanthera laevis</i> Mkgf. ² (E) ³	40	40			100	59	Lésions buccales

¹: Dose: [en mg/kg/4 jours]

²: Muñoz et al.; 2000

³: E: Écorce

⁴: Deharo et al.; 2001

TABLEAU # 7. Suite. Espèces boliviennes actives contre *Plasmodium in vitro* et *in vivo*.

FAMILLE	ESPECES	IC ₅₀ [μg/ml] F32	IC ₅₀ [μg/ml] INDO	Dose ¹	<i>P. vinckei</i> % inhibition	Dose ¹	<i>P. berghei</i> % inhibition	Usage traditionnel
<i>Malpighia- ceae</i>	<i>Mascagnia macrophylla</i> R. ² (E) ³	1.7	2.2	472	58			Diarrhée
<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus amplifolia</i> Pilger ² (E) ³	> 100	> 100			250	60	Rhumatisme, piqûres d'insectes
<i>Rubiaceae</i>	<i>Cinchona calisaya</i> ² (E) ³	0.2	0.2			250 100	91 41	Témoin positif
<i>Vochysia- ceae</i>	<i>Qualea paraensis</i> Ducke ² (E) ³	> 100	> 100	250 100	Toxique 67			Galles

¹: Dose: [en mg/kg/4 jours]

²: Muñoz et al.; 2000

³: E: Écorce

⁴: Deharo et al.; 2001

TABLEAU # 7. Suite. Espèces boliviennes actives contre *Plasmodium in vitro et in vivo*.

La recherche de plantes utilisant l'essai de l'inhibition de l'agrégation du hème en Bolivie a débuté en 2000. Dans ce travail, 178 extraits végétaux provenant de la pharmacopée de l'ethnie Tacana ont été évalués [Baelmans et al., 2000]. Des extraits évalués seulement 5 résultèrent positifs sur l'essai HPIA (essai de l'inhibition de la polymérisation du hème) et de ceux-ci un seul présenta une activité contre *P. falciparum in vitro*. La plante active dans ces essais a été *Caesalpinia pluviosa* laquelle est utilisée contre la dysenterie et la diarrhée. Le Tableau # 8 présente les résultats biologiques des 5 espèces actives dans le test HPIA. Les travaux de Baelmans et ses collaborateurs suggèrent de ne pas réaliser exclusivement les essais de HPIA pour mettre en évidence une activité antiplasmodiale. Deux ans plus tard, Deharo et col valident l'usage de cet essai pour le criblage simplifié des produits naturels antipaludiques, validé par l'obtention d'une CI_{50} de 0.7 mg/ml significative avec la *Rubiaceae Remijia peruviana* S.[Deharo et al., 2001]. Cette *Rubiaceae* appelée faux quinquina est connue pour contenir des dérivés de la quinine.

FAMILLE	ESPECES	F32 IC ₅₀ [μg/ml] ¹	D2 IC ₅₀ [μg/ml] ¹	Dose [mg/kg/4j]	<i>P. berghei</i> % inhibition ²	HPIA % inhibition ¹
<i>Bixaceae</i>	<i>Bixa orellana</i> L. (F) ³	28	33			95
<i>Caesalpinia- ceae</i>	<i>Caesalpinia pluviosa</i> D.C. (E) ³	15	8	500 100	Toxique -	96
<i>Malpighiaceae</i>	<i>Mascagnia stannea</i> (Griseb.) Nied. (E) ³	> 100	> 100			81
<i>Meliaceae</i>	<i>Trichilia pleenea</i> (Adr. Jussieu) (E) ³	> 100	> 100			79
<i>Rubiaceae</i> ⁴	<i>Cinchona calisaya</i> (E) ³	0.9	0.5	250	9	6
<i>Verbenaceae</i>	<i>Aloysia virgata</i> (Ruíz & Pavón) A.L.J. Nied. (E) ³	> 100	> 100			73
Chloroquine ⁵	-	6.3nM	100nM	5	100	94

¹: Baelmans et al., 2000

²: Deharo et al., 2001

³: E: Écorce; F; Feuille

⁴: Témoin naturel

⁵: Témoin synthétique

TABLEAU # 8. Résultats biologiques d'espèces actives dans le test HPIA provenant de la pharmacopée Tacana.

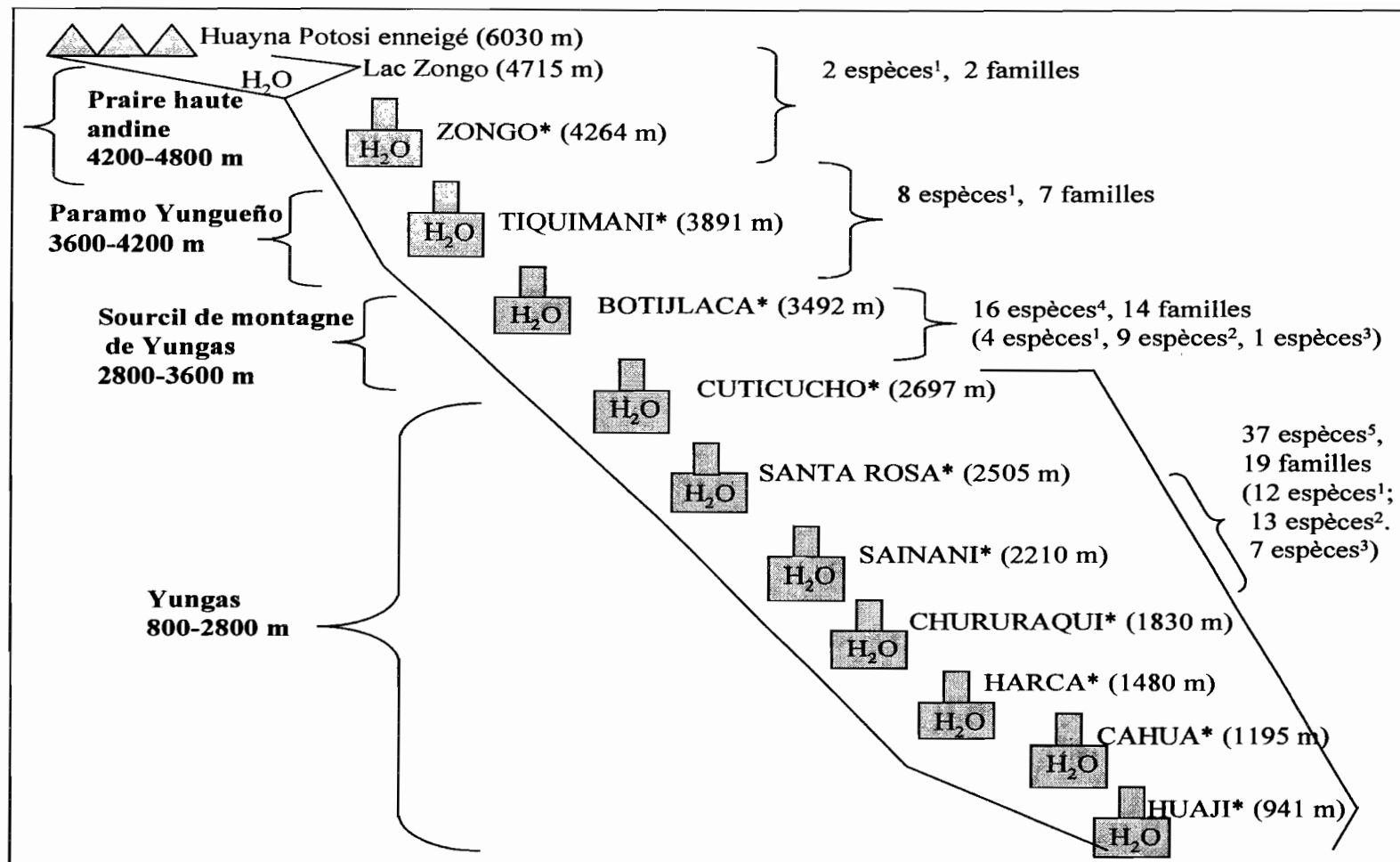
PARTIE III

RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR LES ESPECES PROVENANT DE LA VALLE DE ZONGO

1. Collectes dans la Vallée de Zongo

Nous avons réalisé 3 voyages de collecte dans la vallée de Zongo et 63 plantes ont été récoltées en suivant trois critères de récolte. Ces critères sont : le critère chimio-taxonomique, le critère organoleptique et la collecte en fonction de zones écologiques délimitées par les altitudes (parcelles altitudinales). Les 63 plantes correspondent à 32 familles et à 56 espèces différentes. Plusieurs espèces ont été récoltées plus d'une fois à des dates et dans des lieux différents.

La Figure # 18 montre le résumé des 3 collectes réalisées dans la vallée de Zongo. Dans le même graphique, on peut apprécier le nombre d'espèces sélectionnées, le nombre de familles et le nombre d'espèces collectées en fonction des critères chimio-taxonomiques, organo-leptiques et la collecte par parcelles altitudinales. Dans le graphique, on peut également observer les différents niveaux et écosystèmes les plus représentatifs de la vallée de Zongo. Tout le long de la vallée, on trouve des barrages hydroélectriques, lesquels ont servi de référence altitudinale et d'échantillonnage. Le Tableau # 9 présente un résumé des espèces collectées. Dans le même tableau sont reportés l'espèce collectée, son numéro d'herbier (voucher), sa famille, le lieu de collecte et le critère de collecte suivi.



*Barrage hydroélectrique. Collectes: ¹: altitudinal. ²: organo-leptique. ³: chimio-taxonomique. ⁴: 2 espèces répétées. ⁵: 5 esp. répétées

FIGURE # 18. Collectes dans la Vallée de Zongo

VOUCHER	ESPÈCES	FAMILLE	COLLECTION ¹	ÉTAGE	COLLECTE
RM2999	<i>Bomarea distichophylla</i> (Ruiz & Pav.) Baker	<i>Alstroemeriaceae</i>	19-20 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
RM2995	<i>Bomarea formosissima</i> Ruiz & Pav.	<i>Alstroemeriaceae</i>	19-20 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
SI-20	<i>Oreopanax sp.</i>	<i>Araliaceae</i>	19 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Altitudinal
RM3001	<i>Cynanchum sp.</i>	<i>Asclepiadaceae</i>	23 Km, Cuticucho BH ²	Yungas	Altitudinal
RM3016	<i>Berberis aff. paucidentata</i> Rusby	<i>Berberidaceae</i>	15.1 Km, avant Botijlaja BH ²	Paramo Yungueño	Altitudinal
SI-4	<i>Centropogon gloriosus</i> (Britton) Zahlbr.	<i>Campanulaceae</i>	30 Km	Yungas	Organoleptique
SI-2	<i>Siphocampylus cf. bilabiatus</i> Zahlbr.	<i>Campanulaceae</i>	37 Km	Yungas	Organoleptique
SI-15	<i>Siphocampylus dubius</i> Zahlbr.	<i>Campanulaceae</i>	32 Km	Yungas	Organoleptique
RM2993	<i>Siphocampylus tupaiformis</i> Zahlbr.	<i>Campanulaceae</i>	16 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
SI-1	<i>Siphocampylus sp.</i>	<i>Campanulaceae</i>	30 Km	Yungas	Organoleptique
SI-8	<i>Siphocampylus sp.</i>	<i>Campanulaceae</i>	24 Km	Yungas	Organoleptique
RM3022	<i>Cleome lechleri</i> Eichl.	<i>Capparidaceae</i>	23.9 Km	Yungas	Altitudinal
SI-5	<i>Baccharis pentlandii</i> DC.	<i>Compositae</i>	15 Km, à Botijlaja BH ²	Paramo Yungueño	Altitudinal
RM3017	<i>Barnadesia pycnophylla</i> Muschl.	<i>Compositae</i>	17.3 Km, après Botijlaja BH ²	Sourcil de montagne de Yungas	Chimio-taxonomique
RM3030	<i>Liabum foliosum</i> (Rusby) Ferreyra	<i>Compositae</i>	22.6 Km	Yungas	Chimio-taxonomique
RM3002	<i>Liabum hastifolium</i> Poepp. & Endl.	<i>Compositae</i>	26 Km	Yungas	Chimio-taxonomique
RM3023	<i>Liabum hastifolium</i> Poepp. & Endl.	<i>Compositae</i>	26 Km, cascade	Yungas	Chimio-taxonomique

¹: Kilométrage depuis la digue de Zongo.

²: BH: Barrage hydroélectrique

Collecte I: SI-S26, Collecte II: RM2991-3012, Collecte III: RM3013-3031

TABLEAU #9. Collectes dans la Vallée de Zongo.

VOUCHER	ESPÈCES	FAMILLE	COLLECTION ¹	ÉTAGE	COLLECTE
RM3020	<i>Liabum pinnulosum</i> Kuntze	<i>Compositae</i>	23.7 Km	Yungas	Chimio-taxonomique
RM3028	<i>Oyedaea boliviana</i> Britton	<i>Compositae</i>	31.9 Km	Yungas	Chimio-taxonomique
RM3029	<i>Polymnia parviceps</i> S. F. Blake	<i>Compositae</i>	31.9 Km	Yungas	Chimio-taxonomique
SI-17	<i>Vallea stipularis</i> L.f.	<i>Elaeocarpaceae</i>	19 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Altitudinal
RM3009	<i>Alchornea</i> cf. <i>glandulosa</i> Poepp.	<i>Euphorbiaceae</i>	43 Km	Yungas	Altitudinal
RM2998	<i>Clusia</i> cf. <i>flaviflora</i> Engl.	<i>Guttiferae</i>	19-20 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
RM3008	<i>Clusia martiana</i> Engl.	<i>Guttiferae</i>	43 Km	Yungas	Organoleptique
RM3012	<i>Clusia</i> cf. <i>polyantha</i> Cuatrec.	<i>Guttiferae</i>	43 Km	Yungas	Organoleptique
SI-10	<i>Clusia</i> sp.	<i>Guttiferae</i>	42 Km, avant Cahua BH ²	Yungas	Organoleptique
RM3007	<i>Vismia glaziovii</i> Ruhland (=V. <i>vuchtienii</i> Ewan)	<i>Guttiferae</i>	45 Km	Yungas	Altitudinal
RM3000	<i>Gunnera</i> cf. <i>apiculata</i> Schindl.	<i>Haloragidaceae</i>	22.8 Km	Yungas	Altitudinal
SI-26	<i>Crocosmia</i> x <i>crocosmiiflora</i> (Lemoine ex E. Morren) N.E.Br.	<i>Iridaceae</i>	23.4 Km, Cuticucho BH ²	Yungas	Altitudinal
SI-24	<i>Distichia muscoides</i> Nees & Meyen	<i>Juncaceae</i>	Enneigé Huayna Potosi, lagoon Patakisota	Prairie haute andine	Altitudinal
RM3026	<i>Minthostachys</i> cf. <i>acutifolia</i> Epling	<i>Labiatae</i>	26 Km, près la cascade	Yungas	Altitudinal
RM3025	<i>Stachys aperta</i> Epling	<i>Labiatae</i>	26 Km, cascade	Yungas	Altitudinal
RM3021	<i>Amicia lobbiana</i> Benth. ex Rusby	<i>Leg. Papilionoideae</i>	23.7 Km	Yungas	Altitudinal
RM3006	<i>Dictyonema glabratum</i> (Spreng.) D. Hawksw.	<i>Liquen</i>	45 Km	Yungas	Organoleptique

¹: Kilométrage depuis la digue de Zongo.

²: BH: Barrage hydroélectrique

Collecte I: SI-S26, Collecte II: RM2991-3012, Collecte III: RM3013-3031

TABLEAU # 9 suite. Collectes dans la Vallée de Zongo.

VOUCHER	ESPÈCES	FAMILLE	COLLECTION ¹	ÉTAGE	COLLECTE
SI-22	<i>Dictyonema glabratum</i> (Spreng.) D. Hawksw.	<i>Liquen</i>	45 Km	Yungas	Organoleptique
RM3018	<i>Gaiadendron punctatum</i> (Ruiz & Pav.) G. Don.	<i>Loranthaceae</i>	19 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
SI-19	<i>Gaiadendron punctatum</i> (Ruiz & Pav.) G. Don.	<i>Loranthaceae</i>	19 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
RM3031	<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana	<i>Melastomataceae</i>	21.6 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
RM2997	<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana	<i>Melastomataceae</i>	19- 20 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
SI-16	<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana	<i>Melastomataceae</i>	19 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
RM3019	<i>Miconia boliviensis</i> Cogn.	<i>Melastomataceae</i>	23.7 Km	Yungas	Organoleptique
RM3003	<i>Fuchsia boliviana</i> Carriere	<i>Onagraceae</i>	26 Km	Yungas	Organoleptique
SI-13	<i>Fuchsia cf. denticulata</i> Ruiz & Pav.	<i>Onagraceae</i>	21.7 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
RM3024	<i>Bocconia integrifolia</i> Humb. & Bonpl.	<i>Papaveraceae</i>	26 Km, cascade	Yungas	Chimio-taxonomique
RM3004	<i>Passiflora amethystina</i> J.C. Mikan	<i>Passifloraceae</i>	28 Km, École Cambaya	Yungas	Organoleptique
RM3005	<i>Cobaea scandens</i> Cav.	<i>Polemoniaceae</i>	31 Km	Yungas	Organoleptique
SI-3	<i>Cobaea scandens</i> Cav.	<i>Polemoniaceae</i>	31 Km	Yungas	Organoleptique
RM3027	<i>Cobaea scandens</i> Cav.	<i>Polemoniaceae</i>	31 Km	Yungas	Organoleptique
SI-12	<i>Monnina bridgesii</i> Chodat	<i>Polygalaceae</i>	21.7 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
RM3013	<i>Rumex acetosella</i> L.	<i>Polygonaceae</i>	11.8 Km	Paramo yungeño	Altitudinal
SI-6	<i>Rumex sp.</i>	<i>Polygonaceae</i>	11.8 Km	Paramo yungeño	Altitudinal
SI-9	<i>Rumex obtusifolius</i> L.	<i>Polygonaceae</i>	22 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Altitudinal
SI-7	<i>Rumex sp.</i>	<i>Polygonaceae</i>	22 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Altitudinal

¹: Kilométrage depuis la digue de Zongo.

²: BH: Barrage hydroélectrique

Collecte I: SI-S26, Collecte II : RM2991-3012, Collecte III : RM3013-3031

TABLEAU # 9 suite. Collectes dans la Vallée de Zongo.

VOUCHER	ESPÈCES	FAMILLE	COLLECTION ¹	ÉTAGE	COLLECTE
RM3015	<i>Elaphoglossum mathewssi</i> (Fée) T. Moore	<i>Polypodiaceae</i>	13.8 Km	Paramo yungeño	Altitudinal
RM3014	<i>Polystichum pycnolepis</i> (Klotzsch) T. Moore	<i>Pteridaceae</i>	13.8 Km	Paramo yungeño	Altitudinal
RM2992	<i>Acaena cylindrostachya</i> Ruiz & Pav.	<i>Rosaceae</i>	14 Km	Paramo yungeño	Altitudinal
RM2994	<i>Lachemilla pectinata</i> (Kunth) Rothm.	<i>Rosaceae</i>	19-20 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Altitudinal
SI-25	<i>Rubus briareus</i> Focke	<i>Rosaceae</i>	19 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Organoleptique
RM3010	<i>Condaminea corymbosa</i> (Ruiz & Pav.) DC.	<i>Rubiaceae</i>	43 Km	Yungas	Chimio-taxonomique
RM2991	<i>Escallonia myrtilloides</i> L.f.	<i>Saxifragaceae</i>	14 Km	Paramo yungeño	Altitudinal
RM2996	<i>Agalinis chaparensis</i> Barringer	<i>Scrophulariaceae</i>	19-20 Km	Sourcil de montagne de Yungas	Altitudinal
SI-21	<i>Azorella sp.</i>	<i>Umbelliferae</i>	Enneigé Huayna Potosi, antenna	Prairie haute andine	Altitudinal
SI-11	<i>Costus sp.</i>	<i>Zingiberaceae</i>	34 Km, après Chururaqui BH ²	Yungas	Altitudinal

¹: Kilométrage depuis la digue de Zongo.

²: BH: Barrage hydroélectrique

Collecte I: SI-S26, Collecte II: RM2991-3012, Collecte III: RM3013-3031

TABLEAU # 9 suite. Collectes dans la Vallée de Zongo.

2. Criblage pharmacologique des espèces collectées dans la Vallée de Zongo

Les 63 espèces collectées ont été séchées, leurs différents organes séparés, moulus et extraits avec de l'éthanol. Chaque extrait alcoolique a été soumis au test FBIT et aux essais biologiques contre *Plasmodium falciparum*.

Le Tableau # 10 présente les résultats des essais de FBIT et *P. falciparum* des extraits provenant de la vallée du Zongo.

Nous avons collecté 63 plantes qui correspondent à 32 familles et à 56 espèces différentes. Des 56 espèces différentes, 8 ont été récoltées en suivant le critère chimio-taxonomique, 22 le choix organoleptique et 26 espèces la collecte par parcelles altitudinales. Des 8 espèces collectées suivant le critère chimio-taxonomique, 7 sont actives à 2.5 mg/ml sur le test FBIT avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 60 %. Une de ces espèces, *Liabum hastifolium* (*Loranthaceae*) a été active dans chaque type d'essai (75% d'inhibition sur le test FBIT à la concentration de 2.5 mg/ml y 54 % inhibition contre *P. falciparum in vitro* à 10 µg/ml).

Des 22 espèces collectées suivant le critère organoleptique, seulement 8 inhibent la biocristallisation de la FPIX avec un % d'inhibition égal à 60%. Parmi ces plantes, il est important de souligner que les fleurs lilas de *Brachyotum microdon* (*Melastomataceae*) montrent la plus forte activité contre *P. falciparum in vitro* (97 % inh. à 10 µg/ml). Cependant, les fleurs n'inhibent pas la biocristallisation de la FPIX suggérant que son mécanisme de réaction est différent de celui du test FBIT. D'autre part, les feuilles de cette plante montrent une importante inhibition dans l'essai FBIT (63% inh. à 2,5 mg/ml) mais aucune activité envers *P. falciparum*. Une autre espèce

active est *Miconia boliviensis* (feuilles) qui a présenté des résultats intéressants dans chaque type d'essai (68% inh. sur FBIT à 2,5 mg/ml et 78 % inh. contre *P. falciparum* *in vitro* à 10 µg/ml).

Finalement, des 26 espèces collectées à différentes altitudes, nous avons trouvé seulement 9 plantes actives contre FBIT et aucune d'entre elles active contre *P. falciparum*.

La grande quantité de résultats positifs sur le test FBIT et négatifs contre *P. falciparum* peut être expliquée par l'impossibilité de la molécule active d'atteindre l'hème où il se forme (la vacuole digestive) dans l'essai cellulaire. La molécule active doit en effet passer à travers 4 membranes pour finalement atteindre la vacuole digestive. La première membrane est celle de l'érythrocyte. Les autres membranes correspondent à celles du parasite: la membrane de la vacuole parasitophore, la membrane du cytoplasme et finalement celle de la vacuole digestive. Dans le cas des essais FBIT, le composant actif ne doit passer aucune barrière membranaire.

VOUCHER	ESPÈCES	FAMILLE	CODE ¹	FBIT % inh. ²	<i>P. falciparum</i> % inh. ³
RM2999	<i>Bomarea distichophylla</i> (Ruiz & Pav.) Baker	<i>Alstroemeriaceae</i>	RM2999H	0	0
			RM2999T	0	0
			RM2999Fl	18 (± 10)	0
			RM2999Fr	36 (± 7)	0
RM2995	<i>Bomarea formosissima</i> Ruiz & Pav.	<i>Alstroemeriaceae</i>	RM2995T	0	0
			RM2995H	33 (± 7)	0
			RM2995Fl	54 (± 4)	0
SI-20	<i>Oreopanax sp.</i>	<i>Araliaceae</i>	SI-20H	11 (± 9)	0
RM3001	<i>Cynanchum sp.</i>	<i>Asclepiadaceae</i>	RM3001H	28 (± 8)	0
			RM3001T	21 (± 6)	0
RM3016	<i>Berberis aff.</i> <i>paucidentata</i> Rusby	<i>Berberidaceae</i>	RM3016 H, fl	68 (± 5)	0
			RM3016T	76 (± 13)	0
SI-4	<i>Centropogon gloriosus</i> (Britton) Zahlbr.	<i>Campanulaceae</i>	SI-4H	55 (± 5)	0
			SI-4T	63 (± 7)	0
			SI-4Fl	31 (± 10)	0
SI-2	<i>Siphocampylus cf.</i> <i>bilabiatus</i> Zahlbr.	<i>Campanulaceae</i>	SI-2H	0	0
			SI-2T	5 (± 4)	0
SI-15	<i>Siphocampylus dubius</i> Zahlbr.	<i>Campanulaceae</i>	SI-15H	36 (± 6)	0
			SI-15T	9 (± 7)	0
			SI-15Fl	47 (± 2)	0
RM2993	<i>Siphocampylus</i> <i>tupaeformis</i> Zahlbr.	<i>Campanulaceae</i>	RM2993T	17 (± 3)	0
			RM2993H	24 (± 10)	0
			RM2993Fl	0	0
SI-1	<i>Siphocampylus sp.</i>	<i>Campanulaceae</i>	SI-1H	0	0
			SI-1T	6 (± 16)	0
			SI-1Fl, Fr	11 (± 7)	0

¹: Codes des extraits; H: feuilles, T: tiges, F: fleurs, Fr: fruits ²: FBIT, % inh. à 10 mg/ml. ³: *P. falciparum*, % inh. à 10µg/ml.

TABLEAU #10. Résultats des activités des extraits de plantes du Zongo sur FBIT et *Plasmodium falciparum*.

VOUCHER	ESPÈCES	FAMILLE	CODES ¹	FBIT % inh. ²	<i>P. falciparum</i> % inh. ³
SI-8	<i>Siphocampylus</i> sp.	<i>Campanulaceae</i>	SI-8H	0	0
			SI-8T	0	0
			SI-8Fl	60 (± 2)	0
RM3022	<i>Cleome lechleri</i> Eichl.	<i>Capparidaceae</i>	RM3022H	35 (± 8)	0
			RM3022T	60 (± 6)	0
SI-5	<i>Baccharis pentlandii</i> DC.	<i>Compositae</i>	SI-5H	19 (± 5)	0
			SI-5T	41 (± 3)	0
			SI-5Fl	47 (± 3)	0
RM3017	<i>Barnadesia pycnophylla</i> Muschl.	<i>Compositae</i>	RM3017H	44 (± 6)	0
			RM3017T	72 (± 7)	0
			RM3017Fl	44 (± 7)	0
RM3030	<i>Liabum foliosum</i> (Rusby) Ferreyra	<i>Compositae</i>	RM3030H	78 (± 7)	0
			RM3030T	37 (± 10)	0
			RM3030Fl	79 (± 3)	0
RM3002	<i>Liabum hastifolium</i> Poepp. & Endl.	<i>Compositae</i>	RM3002H	46 (± 11)	54
			RM3002T	48 (± 4)	0
RM3023	<i>Liabum hastifolium</i> Poepp. & Endl.	<i>Compositae</i>	RM3023H	75 (± 2)	58
			RM3023T	75 (± 2)	0
RM3020	<i>Liabum pinnulosum</i> Kuntze	<i>Compositae</i>	RM3020H	73 (± 4)	0
			RM3020T	69 (± 2)	0
			RM3020Fl	74 (± 6)	0
RM3028	<i>Oyedaea boliviana</i> Britton	<i>Compositae</i>	RM3028H	68 (± 11)	0
			RM3028T	61 (± 8)	0
			RM3028Fl	68 (± 8)	0
RM3029	<i>Polymnia parviceps</i> S. F. Blake	<i>Compositae</i>	RM3029H	51 (± 12)	0
			RM3029T	76 (± 12)	0
			RM3029Fl	42 (± 5)	0

¹: Codes des extraits; H: feuilles, T: tiges, F: fleurs, Fr: fruits ²: FBIT, % inh. à 10 mg/ml. ³: *P. falciparum*, % inh. à 10 µg/ml.

TABLEAU #10 suite. Résultats des activités des extraits de plantes du Zongo sur FBIT et *Plasmodium falciparum*.

VOUCHER	ESPÈCES	FAMILLE	CODES ¹	FBIT % inh. ²	<i>P. falciparum</i> % inh. ³
SI-17	<i>Vallea stipularis</i> L.f.	<i>Elaeocarpaceae</i>	RM3017H	44 (± 6)	0
			RM3017T	72 (± 7)	0
			RM3017Fl	44 (± 7)	0
RM3009	<i>Alchornea cf. glandulosa</i> Poepp.	<i>Euphorbiaceae</i>	RM3009T	15 (± 8)	0
			RM3009H	50 (± 8)	0
RM2998	<i>Clusia cf. flaviflora</i> Engl.	<i>Guttiferae</i>	RM2998H	54 (± 4)	0
			RM2998T	52 (± 11)	0
			RM2998Fl	56 (± 4)	0
RM3008	<i>Clusia martiana</i> Engl.	<i>Guttiferae</i>	RM3008T	54 (± 5)	0
			RM3008H	54 (± 2)	0
			RM3008Fl	54 (± 12)	0
			RM3008Fr	56 (± 2)	0
RM3012	<i>Clusia cf. polyantha</i> Cuatrec.	<i>Guttiferae</i>	RM3012T	60 (± 5)	0
			RM3012H	53 (± 3)	0
			RM3012Fl	60 (± 6)	0
SI-10	<i>Clusia</i> sp.	<i>Guttiferae</i>	SI-10H	64 (± 3)	0
			SI-10T	60 (± 11)	0
			SI-10Fl	63 (± 5)	0
RM3007	<i>Vismia glaziovii</i> Ruhland (=V. vuchtienii Ewan)	<i>Guttiferae</i>	RM3007T	46 (± 7)	0
			RM3007H	51 (± 10)	0
RM3000	<i>Gunnera cf. apiculata</i> Schindl.	<i>Haloragidaceae</i>	RM3000H	43 (± 5)	0
			RM3000T	0	0
SI-26	<i>Crocasmia x</i> <i>crocosmiiflora</i> (Lemoine ex E. Morren) N.E.Br.	<i>Iridaceae</i>	SI-26H	0	0
			SI-26T	40 (± 15)	0
			SI-26Fl	21 (± 14)	0
SI-24	<i>Distichia muscoides</i> Nees & Meyen	<i>Juncaceae</i>	SI-24	23 (± 8)	0

¹: Codes des extraits; H: feuilles, T: tiges, F: fleurs, Fr: fruits ²: FBIT, % inh. à 10 mg/ml. ³: *P. falciparum*, % inh. à 10µg/ml.

TABLEAU #10 suite. Résultats des activités des extraits de plantes du Zongo sur FBIT et *Plasmodium falciparum*.

VOUCHER	ESPÈCES	FAMILLE	CODES ¹	FBIT % inh. ²	<i>P. falciparum</i> % inh. ³
RM3026	<i>Minthostachys cf. acutifolia</i> Epling	<i>Labiatae</i>	RM3026H RM3026T	42 (± 5) 49 (± 1)	0 0
RM3025	<i>Stachys aperta</i> Epling	<i>Labiatae</i>	RM3025H RM3025T	69 (± 5) 62 (± 5)	0 0
RM3021	<i>Amicia lobbiana</i> Benth. ex Rusby	<i>Leg. Papilionoideae</i>	RM3021H RM3021T RM3021FI	82 (± 3) 61 (± 4) 39 (± 6)	0 0 0
RM3006	<i>Dictyonema glabratum</i> (Spreng.) D. Hawksw.	<i>Liquen</i>	RM3006	0 (± 1)	0
SI-22	<i>Dictyonema glabratum</i> (Spreng.) D. Hawksw.	<i>Liquen</i>	SI-22	23 (± 8)	0
RM3018	<i>Gaiadendron punctatum</i> (Ruiz & Pav.) G. Don.	<i>Loranthaceae</i>	RM3018H RM3018T	61 (± 3) 53 (± 3)	63 0
SI-19	<i>Gaiadendron punctatum</i> (Ruiz & Pav.) G. Don.	<i>Loranthaceae</i>	SI-19H SI-19T	48 (± 3) 0	61 0
RM3031	<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana	<i>Melastomataceae</i>	RM3031H RM3031T RM3031FI	54 (± 2) 50 (± 6) 11 (± 10)	0 0 97
RM2997	<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana	<i>Melastomataceae</i>	RM2997T RM2997C RM2997S RM2997H	60 (± 9) 0 (± 2) 0 (± 5) 63 (± 6)	0 0 45 54
SI-16	<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana	<i>Melastomataceae</i>	SI-16H SI-16T SI-16FI	63 (± 11) 57 (± 11) 0	0 0 97

¹: Codes des extraits; H: feuilles, T: tiges, F: fleurs, Fr: fruits, C: corolle, S: étamine ²: FBIT, % inh. à 10 mg/ml. ³: *P. falciparum*, % inh. à 10µg/ml.

TABLEAU #10 suite. Résultats des activités des extraits de plantes du Zongo sur FBIT et *Plasmodium falciparum*.

VOUCHER	ESPÈCES	FAMILLE	CODES ¹	FBIT % inh. ²	<i>P. falciparum</i> % inh. ³
RM3019	<i>Miconia boliviensis</i> Cogn.	<i>Melastomataceae</i>	RM3019H	68 (± 6)	78
			RM3019T	81 (±10)	0
RM3003	<i>Fuchsia boliviana</i> Carriere	<i>Onagraceae</i>	RM3003H	49 (± 10)	0
			RM3003Fr	0	0
SI-13	<i>Fuchsia cf. denticulata</i> Ruiz & Pav.	<i>Onagraceae</i>	SI-13H	0	0
			SI-13T	43 (± 4)	0
			SI-13Fl	11 (± 3)	0
			SI-13Fr	40 (± 9)	0
RM3024	<i>Bocconia integrifolia</i> Humb. & Bonpl.	<i>Papaveraceae</i>	RM3024H	55 (±7)	0
			RM3024T	70 (± 8)	0
RM3004	<i>Passiflora amethystina</i> J.C. Mikan	<i>Passifloraceae</i>	RM3004T	42 (± 3)	0
			RM3004H	26 (± 3)	0
			RM3004Fl	28 (± 12)	0
			RM3004Fr	0	0
RM3005	<i>Cobaea scandens</i> Cav.	<i>Polemoniaceae</i>	RM3005T	64 (± 11)	0
			RM3005H	0	0
			RM3005Fr	64 (± 16)	0
			RM3005Fl	0	0
SI-3	<i>Cobaea scandens</i> Cav.	<i>Polemoniaceae</i>	SI-3H	49 (± 3)	0
			SI-3T	49 (± 11)	0
			SI-3Fl	25 (± 4)	0
			SI-3Fr	64 (± 9)	0
RM3027	<i>Cobaea scandens</i> Cav.	<i>Polemoniaceae</i>	RM3027H	19 (± 5)	0
			RM3027T	61 (± 1)	0
			RM3027Fl	73 (± 6)	0
			RM3027Fr	44 (± 4)	0

¹: Codes des extraits; H: feuilles, T: tiges, F: fleurs, Fr: fruits ²: FBIT, % inh. à 10 mg/ml. ³: *P. falciparum*, % inh. à 10µg/ml.

TABLEAU #10 suite. Résultats des activités des extraits de plantes du Zongo sur FBIT et *Plasmodium falciparum*.

VOUCHER	ESPECES	FAMILLE	CODES ¹	FBIT % inh. ²	<i>P. falciparum</i> % inh. ³
SI-12	<i>Monnina bridgesii</i> Chodat	<i>Polygalaceae</i>	SI-12H	11 (± 13)	0
			SI-12T	26 (± 4)	0
			SI-12Fl, Fr	0	0
RM3013	<i>Rumex acetosella</i> L.	<i>Polygonaceae</i>	RM3013	79 (± 3)	0
SI-6	<i>Rumex sp.</i>	<i>Polygonaceae</i>	SI-6H	48 (± 9)	0
SI-9	<i>Rumex obtusifolius</i> L.	<i>Polygonaceae</i>	SI-9H	60 (± 2)	0
SI-7	<i>Rumex sp.</i>	<i>Polygonaceae</i>	SI-7H	42 (± 19)	0
RM3015	<i>Elaphoglossum mathewssi</i> (Fée) T. M.	<i>Polypodiaceae</i>	RM3015H	0	0
RM3014	<i>Polystichum pycnolepis</i> (Klotzsch) T. Moore	<i>Pteridaceae</i>	RM 3014	67 (± 3)	0
RM2992	<i>Acaena cylindrostachya</i> Ruiz & Pav.	<i>Rosaceae</i>	RM2992T	41 (± 5)	0
			RM2992H	12 (± 8)	0
RM2994	<i>Lachemilla pectinata</i> (Kunth) Rothm.	<i>Rosaceae</i>	RM2994H	22 (± 5)	0
			RM2994T	32 (± 6)	0
SI-25	<i>Rubus briareus</i> Focke	<i>Rosaceae</i>	SI-25H	17 (± 6)	0
			SI-25T	24 (± 7)	0
			SI-25Fr	0	0
RM3010	<i>Condaminea corymbosa</i> (Ruiz & Pav.)DC.	<i>Rubiaceae</i>	RM3010T	21 (± 9)	0
			RM3010H	49 (± 4)	0
RM2991	<i>Escallonia myrtilloides</i> L.f.	<i>Saxifragaceae</i>	RM2991T	0	0
			RM2991H	51 (± 7)	0
RM2996	<i>Agalinis chaparensis</i> Barringer	<i>Scrophulariaceae</i>	RM2996T	0	0
			RM2996H	19 (± 17)	0
			RM2996Fl	16 (± 12)	0
			RM2996Fr	40 (± 8)	0
SI-21	<i>Azorella sp.</i>	<i>Umbelliferae</i>	SI-21T	52 (± 4)	0
SI-11	<i>Costus sp.</i>	<i>Zingiberaceae</i>	SI-11H	60 (± 5)	0
			SI-11T	0	0

¹: Codes des extraits; H: feuilles, T: tiges, F: fleurs, Fr: fruits ²: FBIT, % inh. à 10 mg/ml. ³: *P. falciparum*, % inh. à 10µg/ml.

TABLEAU #10 suite. Résultats des activités des extraits de plantes du Zongo sur FBIT et *Plasmodium falciparum*.

Il est important de noter que les espèces qui ont été collectées à différentes époques présentent une variation d'activité dans les essais réalisés (Tableau # 11). On peut apprécier ce fait surtout sur *Liabum hastifolium* et *Gaiadendron punctatum* dont les extraits ont été plus actifs à l'occasion de la collecte de mai. D'un autre côté, les résultats obtenus sur les extraits de *Brachyotum microdon* n'ont pas varié beaucoup durant les 3 collectes. Il est intéressant d'observer que lorsque la fleur de cette *Melastomataceae* a été divisée en corolle et étamine, l'activité élevée de la fleur contre *P. falciparum* (97 % inhibition à 10 µg/ml.) tombe brutalement à la moitié dans chaque organe (45 % inhibition pour les étamines et 54 % inh. pour la corolle).

Le Tableau # 12 se réfère à ces espèces qui présentèrent une inhibition supérieure à 60% dans le test FBIT, de la même manière, nous incluons les résultats contre *Plasmodium*. Grâce à ce tableau, nous pouvons observer que les espèces *Liabum hastifolium* (*Compositae*), *Gaiadendrum punctatum* (*Loranthaceae*), *Brachyotum microdon* (*Melastomataceae*) et *Miconia boliviensis* (*Melastomataceae*) sont actives dans les deux essais.

Liabum hastifolium (*Compositae*): Cette plante est connue également comme *Munnozia maronii* et a été travaillée en Bolivie et en France pour son activité contre la leishmaniose. Dans ce travail, il est reporté la caractérisation du principe actif antileishmanien, la déhydrozaluzanine C, une sesquiterpène lactone [Fournet et al.,1993].

Gaiadendrum punctatum (*Loranthaceae*): Aucun travail ethnomédical ou chimique n'a été reporté. Il n'existe pas non plus de travaux sur le genre.

Brachyotum microdon (Melastomataceae): Aucun travail ethnomédical ou chimique reporté. Dans le genre, on trouva que *Brachyotum radula* est utilisé pour soulager les maladies vénériennes au Pérou [Banque agricole du Pérou, 1988].

Miconia boliviensis (Melastomataceae): Aucun travail ethnomédical ou chimique reporté dans cette espèce. En ce qui concerne le genre *Miconia*, plusieurs travaux pharmacologiques sur des extraits et des composés isolés de ces plantes ont été effectués. Les extraits et les composés ont démontré des activités biologiques variées à savoir: antibactériens, antitumoraux, analgésiques et antipaludiques [Gunatilaka et.al., 2001; Antoun et.al., 1993; Hasrat et.al., 1997]. Des publications récentes présentent *M. fallas* y *M. srtenostachya* comme porteuses d'activité trypanocide [Cunha et.al., 2003]. Parmi les composés séparés de ce genre, on trouve des benzoquinones et des acides triterpéniques.

La plante qui nous a paru la plus intéressante à travailler fut *Brachyotum microdon* (Melastomataceae) dû aux résultats encourageants d'activités antiplasmodiales sur les fleurs et à aucune publication de caractérisation chimique ou d'activité pharmacologique sur l'espèce et le genre.

Nous avons débuté un travail sur *Gaiadendrum punctatum* (Loranthaceae) qui a révélé une grande quantité de composants très polaires. Il a été décidé de ne pas poursuivre cette étude du fait de la polarité et de la complexité de la fraction active. Des composants du type cardiotoniques (polaires et toxiques) ont été en effet isolés dans la famille des *Loranthaceae*.

Il a été envisager d'étudier *Miconia boliviensis*. Mais cette espèce a été récoltée en très petite quantité lors de notre dernière expédition. Depuis la vallée de Zongo a été fermée pendant plus d'un an pour cause d'inondation et il a été impossible de récolter de nouveau cette plante dans le cadre de ce travail.

VOUCHER	ESPÈCES	COLLECTE	CODE ¹	FBIT % inh. ²	<i>P. falciparum</i> % inh. ³
RM3002	<i>Liabum hastifolium</i> Poepp. & Endl.	26 Km, Collecte II	RM3002H RM3002T	46 (± 11) 48 (± 4)	54 0
RM3023	<i>Liabum hastifolium</i> Poepp. & Endl.	26 Km, Collecte III	RM3023H RM3023T	75 (± 2) 75 (± 2)	58 0
RM3018	<i>Gaiadendron punctatum</i> (Ruiz & Pav.) G. Don.	18.4 Km, Collecte III	RM3018H RM3018T	61 (± 3) 53 (± 3)	63 0
SI-19	<i>Gaiadendron punctatum</i> (Ruiz & Pav.) G. Don.	19 Km, Collecte I	SI-19H SI-19T	48 (± 3) 0	61 0
RM3031	<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana	21.6 Km, Collecte III	RM3031H RM3031T RM3031Fl	54 (± 2) 50 (± 6) 11 (± 10)	0 0 97
RM2997	<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana	19- 20 Km, Collecte II	RM2997T RM2997C RM2997S RM2997H	60 (± 9) 0 (± 2) 0 (± 5) 63 (± 6)	0 54 45 54
SI-16	<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana	19 Km, Collecte I	SI-16H SI-16T SI-16Fl	63 (± 11) 57 (± 11) 0	0 0 97
RM3005	<i>Cobaea scandens</i> Cav.	31 Km, Collecte II	RM3005T RM3005H RM3005Fr RM3005Fl	64 (± 11) 0 64 (± 16) 0	0 0 0 0
SI-3	<i>Cobaea scandens</i> Cav.	28 Km, Collecte I	SI-3H SI-3T SI-3Fl SI-3Fr	49 (± 3) 49 (± 11) 25 (± 4) 64 (± 9)	0 0 0 0
RM3027	<i>Cobaea scandens</i> Cav.	33 Km, Collecte III	RM3027H RM3027T RM3027Fl RM3027Fr	19 (± 5) 61 (± 1) 73 (± 6) 44 (± 4)	0 0 0 0

¹: Codes des extraits; H: feuilles, T: tiges, F: fleurs, Fr: fruits, C: corolle, S: étamine ²: FBIT, % inh. à 10 mg/ml. ³: *P. falciparum*, % inh. à 10 µg/ml.

TABLEAU #11. Comparaison des résultats obtenus sur le test FBIT et *P. falciparum* des espèces collectées durant différentes périodes.

ESPECES	FAMILLE	CODES ¹	FBIT % inh. ²	<i>P. falciparum</i> % inh. ³
<i>Berberis aff. paucidentata</i> Rusby	<i>Berberidaceae</i>	RM3016H, fl RM3016T	68 (± 5) 76 (± 13)	0 0
<i>Centropogon gloriosus</i> (Britton) Zahlbr.	<i>Campanulaceae</i>	SI-4T	63 (± 7)	0
<i>Cleome lechleri</i> Eichl.	<i>Capparidaceae</i>	RM3022T	60 (± 6)	0
<i>Liabum pinnulosum</i> Kuntze	<i>Compositae</i>	RM3020H RM3020T RM3020Fl	73 (± 4) 69 (± 2) 74 (± 6)	0 0 0
<i>Liabum hastifolium</i> Poepp. & Endl.	<i>Compositae</i>	RM3023H RM3023T	75 (± 2) 75 (± 2)	58 0
<i>Liabum foliosum</i> (Rusby) Ferreyra	<i>Compositae</i>	RM3030H RM3030Fl	78 (± 7) 79 (± 3)	0 0
<i>Barnadesia pycnophylla</i> Muschl.	<i>Compositae</i>	RM3017T	72 (± 7)	0
<i>Oyedaea boliviana</i> Britton	<i>Compositae</i>	RM3028H RM3028T RM3028Fl	68 (± 11) 61 (± 8) 68 (± 8)	0 0 0
<i>Polymnia parviceps</i> S. F. Blake	<i>Compositae</i>	RM3029T	76 (± 12)	0
<i>Vallea stipularis</i> L.f.	<i>Elaeocarpaceae</i>	RM3017T	72 (± 7)	0
<i>Clusia cf. polyantha</i> Cuatrec.	<i>Guttiferae</i>	RM3012T RM3012Fl	59 (± 5) 60 (± 6)	0 0
<i>Stachys aperta</i> Epling	<i>Labiatae</i>	RM3025H RM3025T	69 (± 5) 62 (± 5)	0 0
<i>Amicia lobbiana</i> Benth. ex Rusby	<i>Leg. Papilionoideae</i>	RM3021H RM3021T	82 (± 3) 61 (± 4)	0 0
<i>Gaiadendron punctatum</i> (Ruiz & Pav.) G. Don.	<i>Loranthaceae</i>	SI-19H	48 (± 3)	61
<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana	<i>Melastomataceae</i>	SI-16H SI-16T SI-16Fl	63 (± 11) 57 (± 11) 0	0 0 97

¹: Codes des extraits; H: feuilles, T: tiges, F: fleurs, Fr: fruits ²: FBIT, % inh. à 10 mg/ml. ³: *P. falciparum*, % inh. à 10 µg/ml

TABLEAU #12. Comparaison des activités des principaux extraits sur FBIT et contre *P. falciparum*.

ESPÈCES	FAMILLE	CODES ¹	FBIT % inh. ²	<i>P. falciparum</i> % inh. ³
<i>Miconia boliviensis</i> Cogn.	<i>Melastomataceae</i>	RM3019H RM3019T	68 (± 6) 81 (±10)	78 0
<i>Bocconia integrifolia</i> H. & B.	<i>Papaveraceae</i>	RM3024T	70 (± 8)	0
<i>Cobaea scandens</i> Cav	<i>Polemoniaceae</i>	RM3005T	64 (± 11)	0
<i>Rumex obtusifolius</i> L.	<i>Polygonaceae</i>	SI-9H	60 (± 2)	0
<i>Rumex acetosella</i> L.	<i>Polygonaceae</i>	RM3013	79 (± 3)	0
<i>Polystichum pycnolepis</i> (Klotzsch) T. Moore	<i>Pteridaceae</i>	RM 3014	67 (± 3)	0

¹: Codes des extraits; H: feuilles, T: tiges, F: fleurs, Fr: fruits ²: FBIT, % inh. à 10 mg/ml. ³: *P. falciparum*, % inh. à 10µg/ml

TABLEAU #12 suite. Comparaison des activités des principaux extraits sur FBIT et contre *P. falciparum*.

3. Séparation et identification d'inhibiteurs de FPIX isolés de *Brachyotum microdon* (Melastomataceae)

A. Antécédents

1. Information Botanique

Arbuste ou arbrisseau de tiges droites, feuilles ovales à oblongue de 1 à 7 cm de long et jusqu'à 3 cm de large portant des poils rigides et pointus disposés en faisceaux sur toute la feuille qui est entière et trinervée. Fleurs abondantes, calice rouge, corolle violette obscure quasi violette de taille jusqu'à 2,5 cm de long. Fruits avec de nombreuses graines.

Caractères botaniques:

Embranchement: Spermaphytes
Sous embranchement: Angiospermes
Classe: Dicotylédones o Magnoliopsida
Sous classe: Rosidae
Ordre: Myrtales
Famille: Melastomataceae
Genre: <i>Brachyotum</i>
Espèce: <i>Brachyotum microdon</i>

La Figure # 19 présente la photographie de *Brachyotum microdon* collecté dans la Vallée de Zongo.



FIGURE # 19. Photographie de *Brachyotum microdon* collecté dans la Vallée de Zongo.

2. Information Chimique et Biologique

Aucun travail ethnomédical ou chimique n'a été reporté pour *Brachyotum microdon*. Dans la recherche bibliographique sur le genre, on trouve que *Brachyotum radulaest* est utilisé pour soulager les maladies vénériennes au Pérou [Banque Agricole du Pérou, 1988].

B.Séparation bioguidée

À l'occasion de la seconde collecte réalisée dans la Vallée de Zongo (février 2002), on a collecté des feuilles et des fleurs de *Brachyotum microdon*. Chaque organe a été séché et moulu pour réaliser une extraction solide-liquide.

Les fleurs de *Brachyotum* ont été macérées à température ambiante durant 48 hr dans de l'éthanol. L'extrait obtenu a été filtré et évaporé à sec. Le rendement de l'extraction a été de 5.7% mais effectué sur une très faible quantité de fleurs (1g) ce qui n'a pas permis de poursuivre la séparation. Il faut toutefois noter que l'on a réalisé des essais de la fleur complète et des parties de cette dernière (calice et corolle) sur FBIT et contre *Plasmodium falciparum*. Le Tableau # 13 présente les résultats d'activité sur ces extraits. Comme on peut le remarquer dans le tableau, aucun des extraits n'est actif contre FBIT mais la fleur entière présente une activité importante contre le parasite. On peut également apprécier qu'à l'occasion de la séparation des organes de la fleur en calice et corolle, l'activité se manifeste seulement dans la corolle et est réduite à presque la moitié de sa valeur initiale.

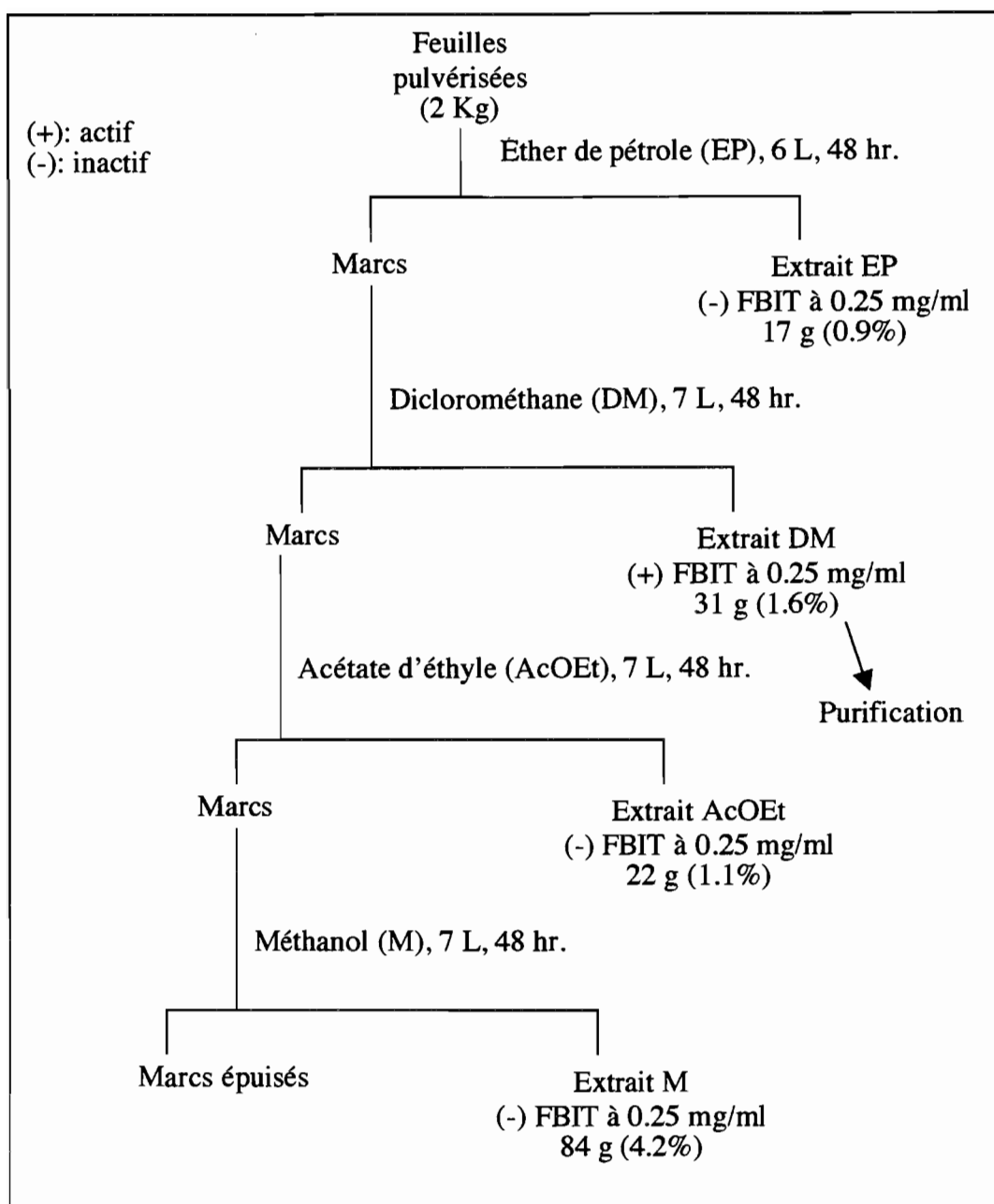
Extrait	FBIT % inhibition [2.5 mg/ml] ¹	<i>Plasmodium falciparum</i> % inhibition [10 µg/ml]
Feuilles	63	-
Tiges	57	-
Fleur entière	-	97
Corolle	-	54
Calice	-	-

¹: 0.5 mg/ml de Cl- hémimine

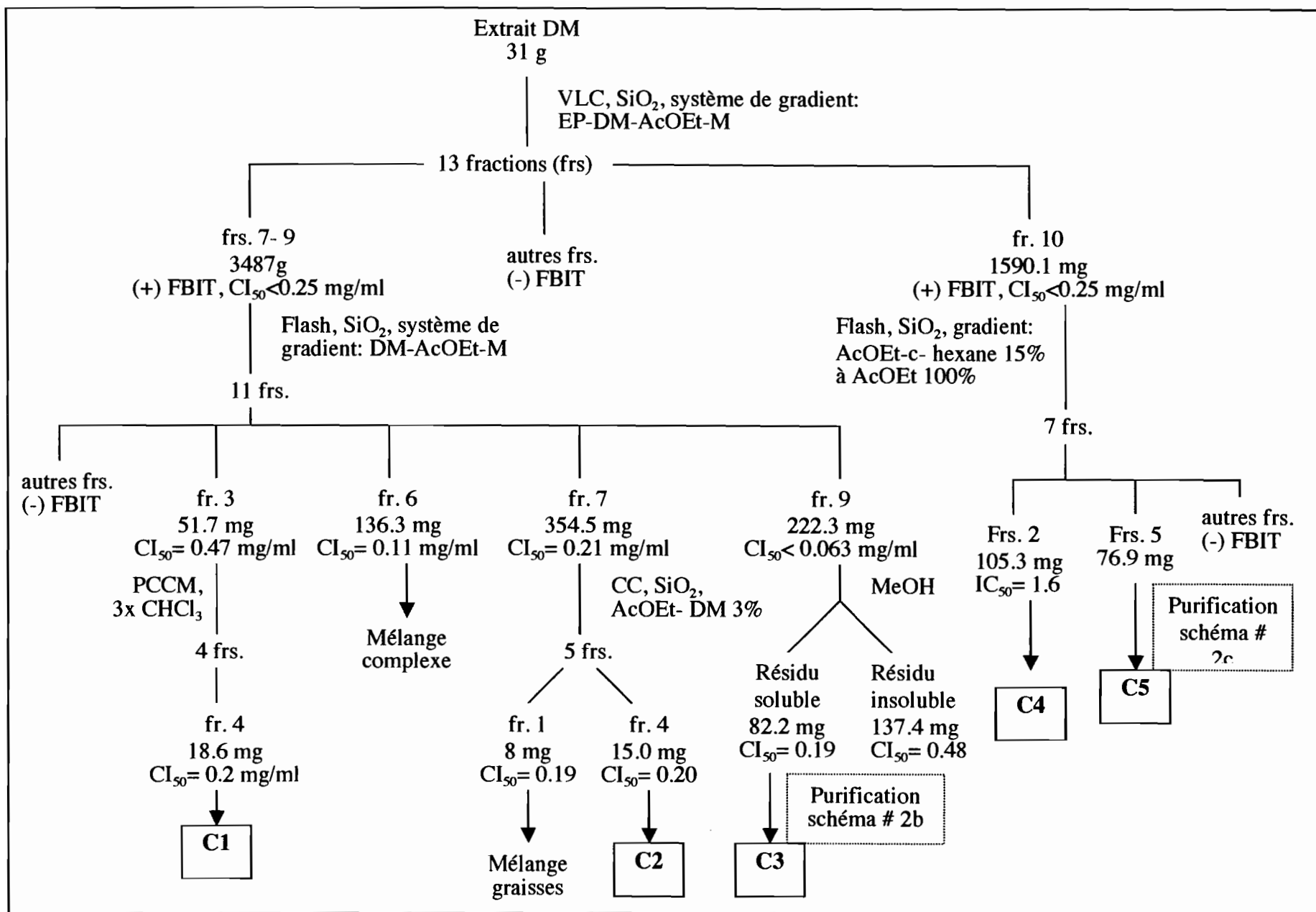
Tableau #13 Résultats de l'activité des organes de *Brachyotum microdon* sur le test FBIT et sur *Plasmodium falciparum*.

On a initié le travail phytochimique d'isolement de principes actifs des feuilles bioguidé par le test FBIT dans l'hypothèse de pouvoir séparer un métabolite actif grâce à son activité d'inhibition de la polymérisation de l'hème et de vérifier ensuite son niveau d'activité contre *P. falciparum*. Nous avons la certitude qu'il existe dans les fleurs de cette plante un métabolite très actif contre le parasite. En tout hypothèse, il pourrait exister dans les feuilles des métabolites similaires dont l'activité n'est pas appréciée dans l'essai avec *Plasmodium* dû à leur faible concentration dans les feuilles ou au fait que le test FBIT permet de mesurer directement une activité sans que le composé actif ne doive traverser une série de barrières membranaires pour atteindre la vacuole digestive et ainsi démontrer sa capacité inhibitrice de la biocristallisation de l'hème.

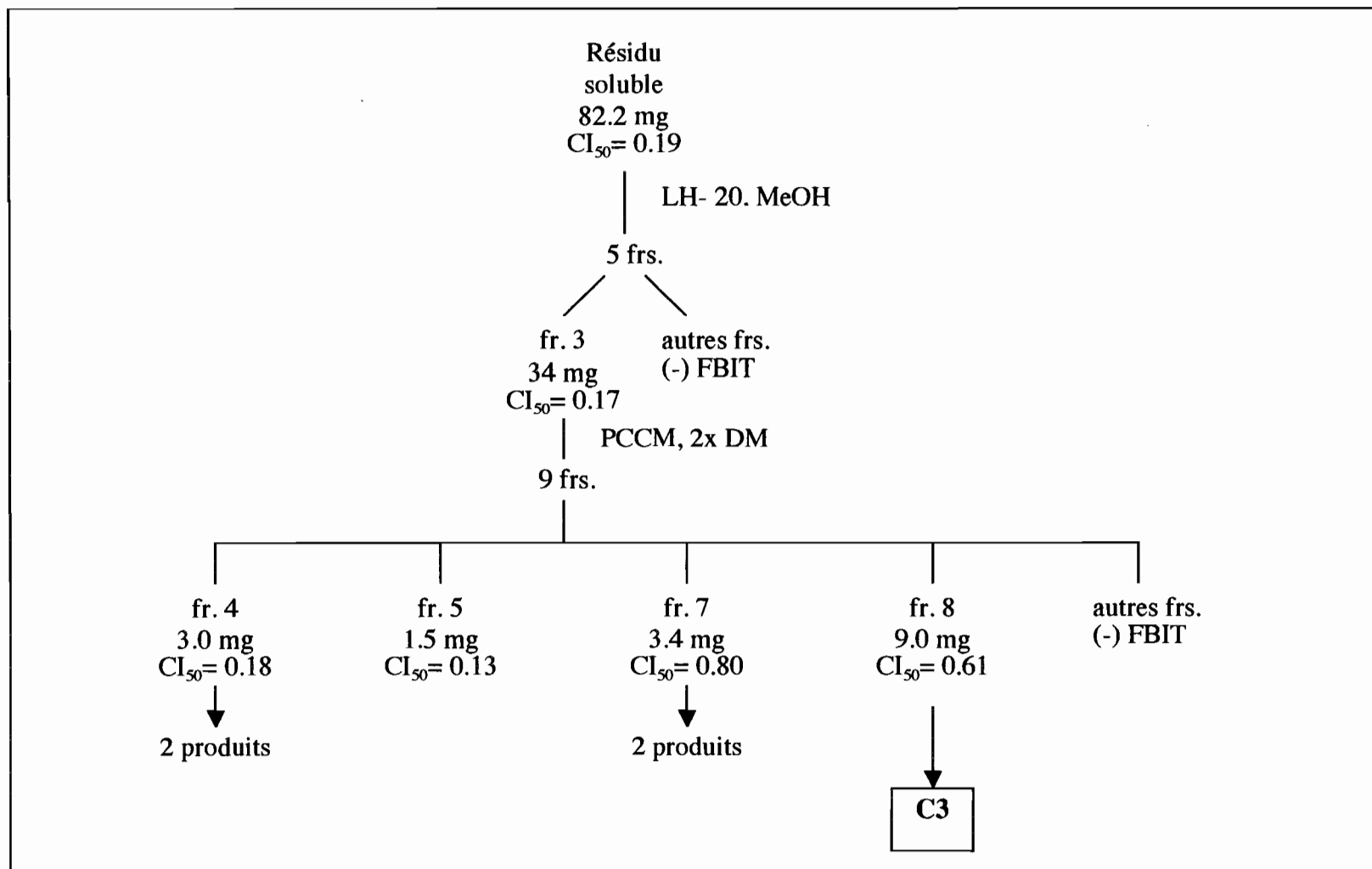
Après pulvérisation, les feuilles (2Kg) de *B. microdon* ont été extraites à l'aide de une cascade de solvants selon un protocole représenté sur le Schéma # 1. La purification des composés actifs provenant de l'extrait au dichlorométhane des feuilles de *B. microdon* est présentée dans le Schéma # 2. De cette purification, nous avons obtenu 5 composés actifs. Les analyses spectroscopiques ont conduit à identifier C1 comme un mélange d'alcool gras ($C_{34}H_{70}O$, $C_{32}H_{66}O$, $C_{30}H_{62}O$, $C_{28}H_{58}O$ et $C_{26}H_{54}O$), C2 comme le β -sitostérol, C3 l'acide oléanolique, C4 l'acide ursolique et C5 l'acide corosolique.



SCHEMA # 1. Extraction à partir des feuilles de *Brachyotum microdon*.



SCHEMA # 2. Purification de l'extrait au dichlorométhane des feuilles de *Brachyotum microdon*.



SCHEMA # 2b. Suite. Purification de l'extrait au dichlorométhane des feuilles de *Brachyotum microdon*.

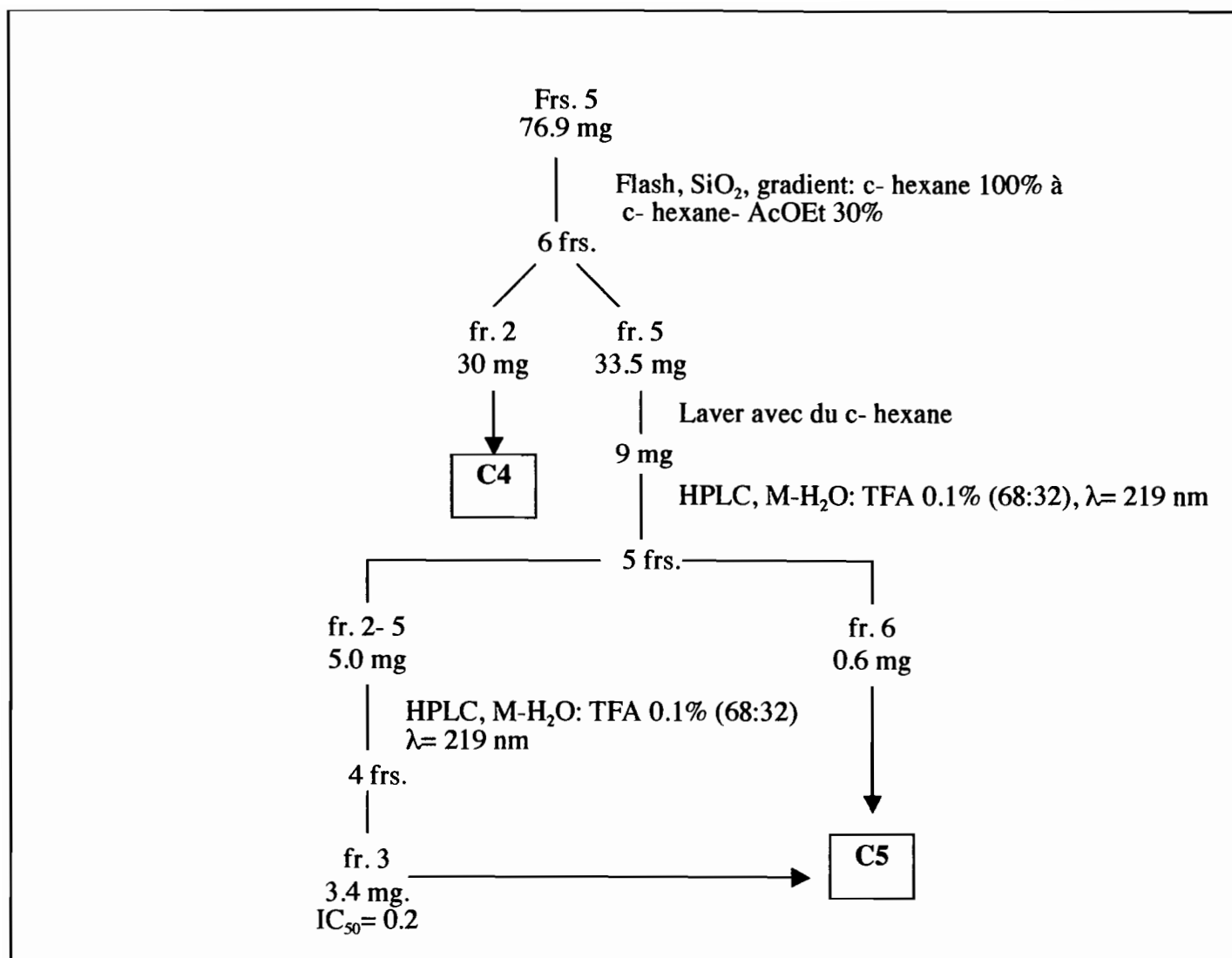


SCHÉMA # 2c. Suite. Purification de l'extrait au dichlorométhane des feuilles de *B. microdon*.

4. Séparation et identification d'inhibiteurs de FPIX

isolés de *Rumex obtusifolius* L (*Polygonaceae*)

A. Antecedents

1. Information Botanique

Herbe pérenne, glabre, de tiges droites semblables à celle d'une graminée, de 40 à 100 cm de hauteur. Feuilles inférieures largement pétiolées, avec un limbe ovale, arrondie ou couronné à la base, entière et un peu crépu sur la marge de 150 à 250 mm de long pour 70 à 100 mm de large. Les feuilles supérieures oblongues ou oblongues – lancéolées , plus petites avec un pétiole plus court. Panicules allongées, lâches, sans feuilles. Fleurs pédonculées avec un ensemble calice-corolle de 2 mm de long, sépales obtus. Fruits avec des valves ovoïdes triangulaires aiguës, couronnés à la base. Profondément denté dans la partie inférieure de la marge membraneuse, avec des cals peu développés, de 4 à 5 mm de long [Cabrera, 1967].

Caractères botaniques:

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones o Magnoliopsida

Sous classe: Caryophyllidae

Ordre: Polygonales

Famille: Polygonaceae

Genre: *Rumex*

Espèce: *Rumex obtusifolius* L.

Nom aymara: Qentu, Qentulawra

Nom quechua: Qenturaya, Loq'oloq'o

Nom castellano: Romaza, Lengua de vaca, Bijuaca'

La racine cuite de *Rumex obtusifolius* prise trois fois par jour, s'utilise contre l'ictère, la fièvre, le mauvais fonctionnement des intestins, la constipation le paludisme, ou la malaria. Cette même connaissance est également utile contre les allergies, les galles et les autres maladies de la peau. Les feuilles fraîches et moulues de cette plante s'appliquent comme des cataplasmes sur les tumeurs, abcès ou furoncles pour les ramollir et faire en sorte que l'inflammation disparaisse. Ces mêmes cataplasmes appliqués sur des blessures, des plaies et des ulcères, ont la vertu de les faire cicatriser. Le "sudado" (un type de macération) obtenue de cette Polygonaceae est utilisé comme collyre pour guérir la conjonctivite, l'orgelet, la vue brouillée ou le rougissement des yeux. La racine de *Rumex obtusifolius* mélangée avec d'autres plantes possède une grande variété d'utilisations traditionnelles. Par exemple, associée aux feuilles d'Andres Waylla (*Cestrum parquii*), on les utilise contre la furonculose. Avec les feuilles de sauge, elles sont bonnes contre les douleurs de lumbago. Elles sont associées à la queue de cheval (*Equisetum arvense*) pour les douleurs menstruelles et pour l'inflammation des reins; avec les feuilles d'Altea (guimauve) pour la leucorrhée, avec des petites branches de Q'owa (*Mintostachys mollis*) pour les vomissements et les nausées, avec les fleurs de Jamillu (*Loranthus striatus*) pour soulager la cystite, la néphrite ou la gastroentérite. [Girault, 1984; Zalles, 1993]. La Figure # 20 présente la photo de *Rumex obtusifolius* L.

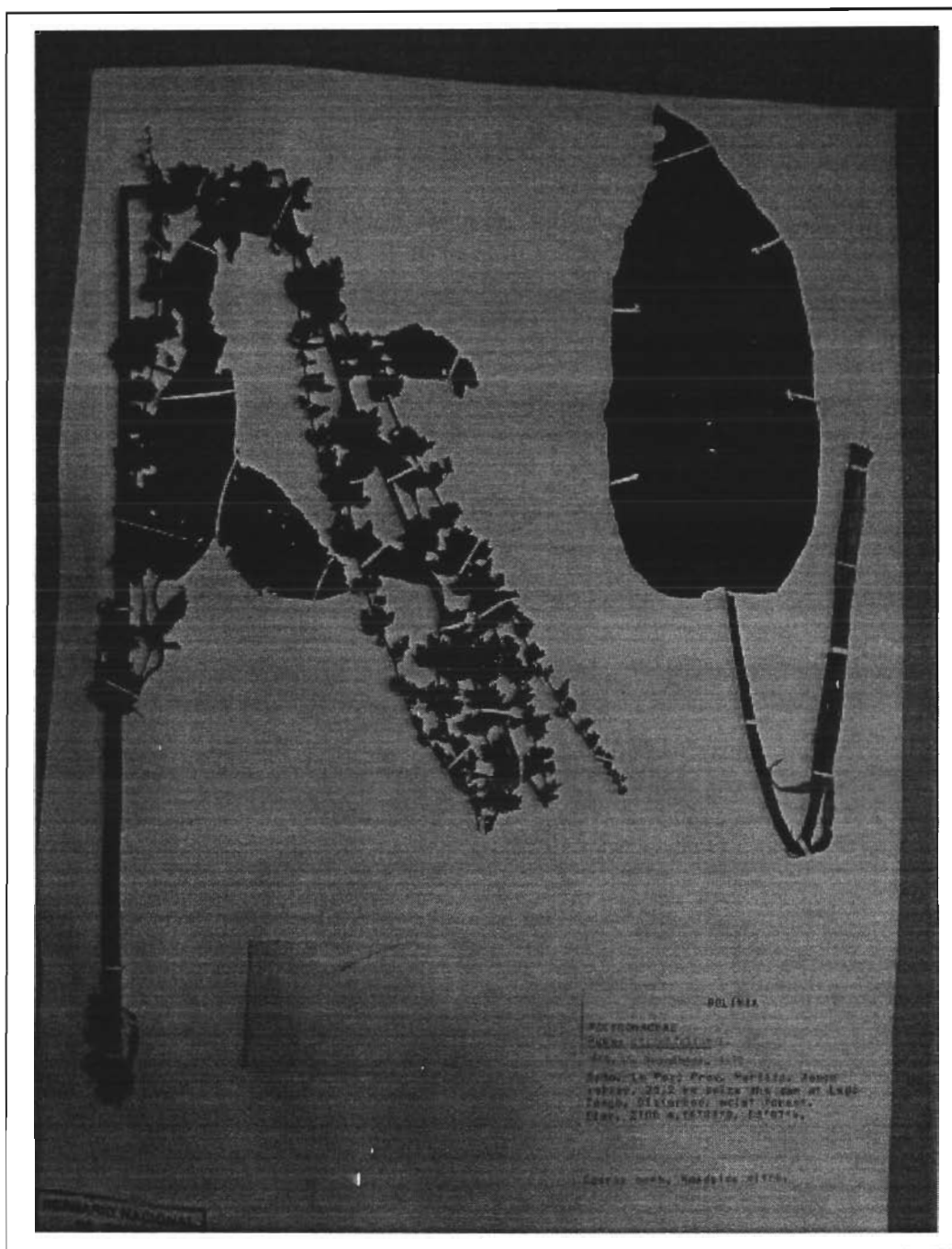


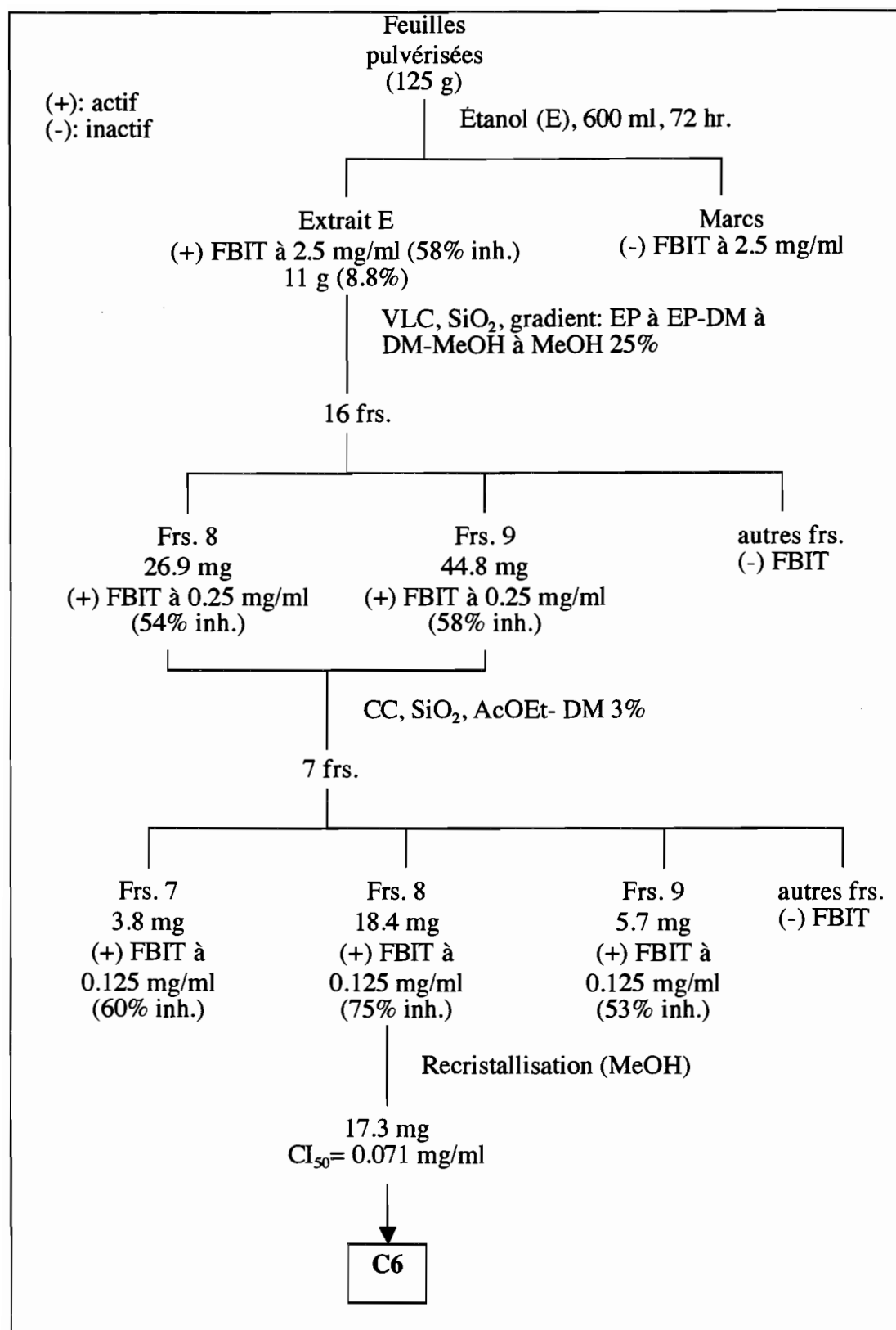
FIGURE # 20. *Rumex obtusifolius* collectée dans la vallée du Zongo.

2. Information chimique et biologique

L'espèce *Rumex obtusifolius* a été travaillée en chimie. Dans un de ces travaux, un glucopyranoside: le 6- o- malonyl- β - méthyle- glucopyranoside a été purifié des racines [Kasai et al., 1981]. Un autre travail a permis l'isolement et la caractérisation d'un acide aminé, la plastocyanine [Haslett et al., 1978]. Il a également été reporté la séparation d'anthraquinones de plusieurs espèces de *Rumex*, [Hasan et al., 1995; Midiwo et al., 1985; Munavu et al., 1984; Harborne et al., 1977], ainsi que de naphthalènes glycosilés [Demirezer et al., 2001], de α - naphtoles [Bauch et al., 1975], de naphthalènes simples, de tanins [Demirezer et al. 1997; Suri et al., 1978], de dérivés anthracéniques [Fassil et al., 1985], de dérivés de naphtoquinones [Sharma et al., 1977; Demirezer et al. 1997; Suri et al. 1978] et des flavonoïdes glycosilés [Hasan et al., 1995].

B.Séparation bioguidée

Des plantes entières de *Rumex obtusifolius* ont été collectées au niveau de la crête de montagne des Yungas lors de la seconde expédition dans la vallée de Zongo (février 2002). Les feuilles de cette espèce (125 g) ont été séchées, moulues et extraites deux fois avec de l'éthanol. Le Schéma # 3 enferme la purification du composé actif provenant de l'extrait alcoolique des feuilles de *Rumex obtusifolius*. De cette purification, nous avons obtenu un composé actif. Les analyses spectroscopiques ont conduit à identifier C6 comme l'isomère de la déméthylmacrosporine (déméthylmacrosporine I).



SCHEMA # 3. Purification du composé actif à partir des feuilles de *Rumex obtusifolius*.

PARTIE IV

TRAVAUX SUPPLÉMENTAIRES SUR DES ESPECES AMAZONIENNES

1. Intérêt d'étudier des espèces amazoniennes

La première sélection de plantes médicinales antipaludiques a été réalisée en 1947 par l'entreprise américaine Merck. Six cents plantes médicinales de différentes origines ont été évaluées avec un modèle de *Plasmodium* infectant les oiseaux. Le résultat de cette recherche a été la valorisation de nombreuses espèces utilisées comme fébrifuges dans l'Amazonie. Parmi celles-ci, les familles des *Simaroubaceae* et des *Rubiaceae* ont été mentionnées comme les plus prometteuses par la forte activité antipaludique de la plupart des espèces de ces familles. En Amérique Latine, la première étude sur l'activité antiplasmodiale des *Simaroubaceae* a été réalisée en Guyane française sur *Picrolemna pseudocoffea* Ducke. De cette plante, Fandeur et col ont isolé le sergéolide qui à très faibles concentrations ($0.006\mu\text{g/ml}$), est capable d'inhiber complètement la croissance de souches sensibles et résistantes à la chloroquine de *Plasmodium falciparum*. De même, de faibles quantités (0.26 mg/Kg/jour) réduisent l'infection à *P. berghei*. Malheureusement, ce terpène oxygéné n'est pas utile pour le traitement du fait de sa toxicité élevée [Fandeur et al., 1985]. En Bolivie, on a isolé de l'écorce de *Pogonopus tubulus* K. Schum. (*Rubiaceae*) la tubulosine. Cet alcaloïde indolo-isoquinoléique se caractérise par sa forte activité avec des $\text{CI}_{50} = 0.011\ \mu\text{g/ml}$ et de $\text{C}_{50} = 0.006\ \mu\text{g/m}$ respectivement contre les souches résistantes et sensibles de *P. falciparum*. De plus, la tubulosine présente une $\text{DE}_{50} = 0.45$

mg/Kg/jour contre *P. berghei* [Sauvain et al., 1996]. La Figure # 21 présente ces deux molécules représentantes de la médecine amazonienne.

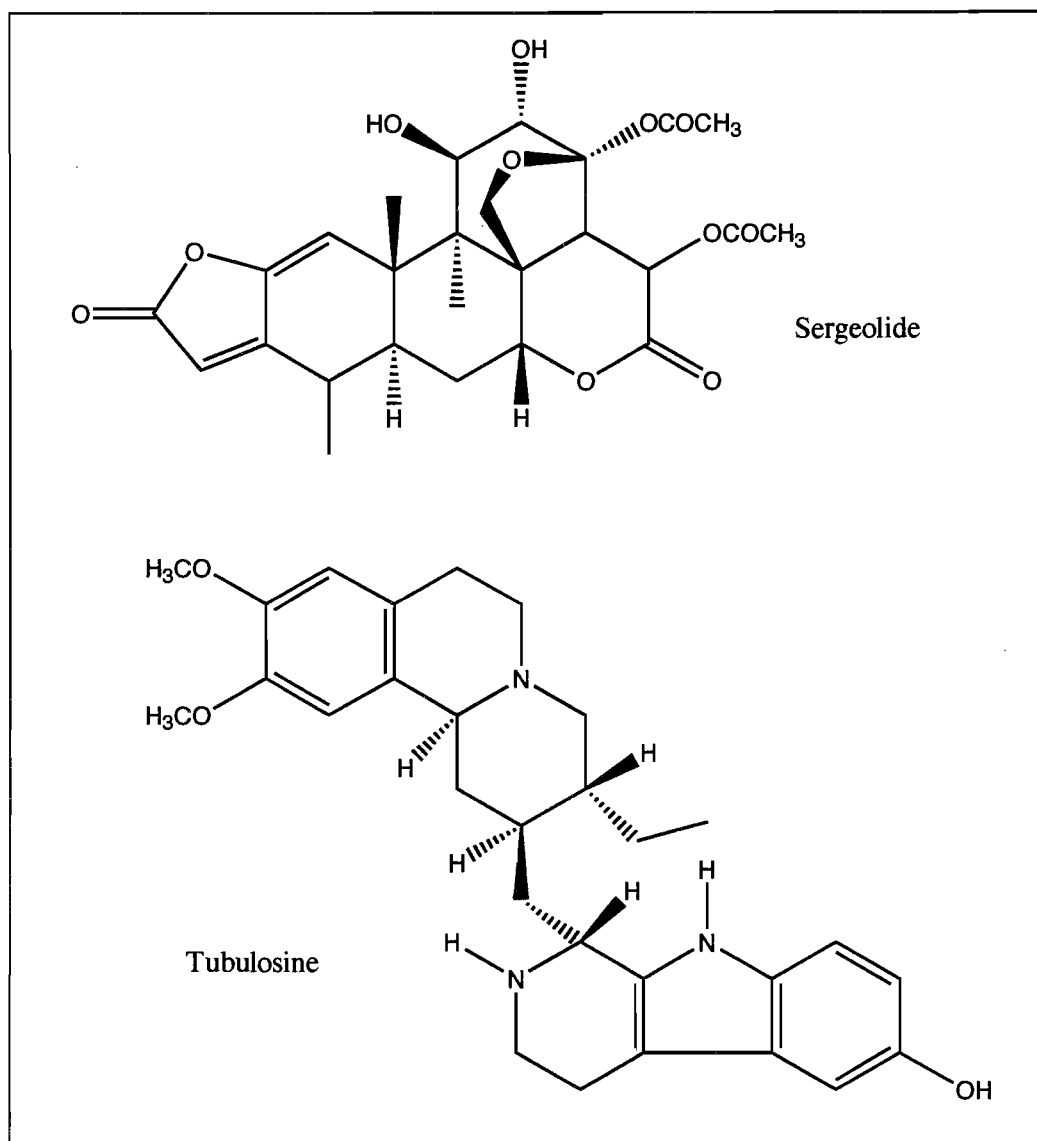


FIGURE #21. Molécules isolées des familles les plus prometteuses contre la malaria en Amazonie.

Nous allons présenter maintenant le travail que nous avons réalisé sur deux espèces amazoniennes provenant de la Guyane française et de Bolivie.

2. Séparation et identification d'inhibiteurs de FPIX isolés de *Gustavia augusta* (Lecythidaceae)

A. Révisión bibliographique

De l'écorce du tronc de *Gustavia augusta* L, des travaux antérieurs ont permis l'isolement de 4 triterpènes, deux d'entre eux dérivés du noyau friedoléane et les deux autres du stigmasterol et du cholestane. On reporte également la présence de stigmasterol, α - amyrin, β - amyrin, lupéol, 3- α - hydroxy-lupéol et acide bétulinique [De Souza et al., 2001].. On ne reporte aucune étude biologique. D'une espèce du même genre, *Gustavia hexapetala*, la gustastatine, l'acide bétulinique, la xanthylétine, la lichexanthone, l'acide oléanolique et l'acide ursolique ont été isolés. Tous ces composés inhibent la croissance de cellules tumorales [Pettit, et al. 2004].

B. Séparation bioguidée

Des extraits organiques et aqueux de graines et d'arilles de *Gustavia augusta* ont été envoyés depuis la Guyane suite à une collecte réalisée en 2001. Le Tableau # 14 présente les résultats de FBIT à 2.5 mg/ml d'hémine obtenus sur les extraits.

ORGANE	EXTRAIT	CODE	POID [g]	FBIT (%Inh.)
Graines	CHCl ₃	GAGC	4.12	67
Graines	H ₂ O	GAGA	3.30	65
Arilles	H ₂ O	GAAA	2.20	49

TABLEAU # 14. Résultats des tests FBIT obtenus sur les extraits provenant de *Gustavia augusta*.

On a décidé de travailler avec l'extrait chloroformique des graines de *Gustavia augusta*. Aucun des extraits évalués contre FBIT n'a présenté une activité contre *Plasmodium falciparum in vitro* (10 µg/ml).

Quatre grammes de l'extrait chloroformique des graines de la plante ont été soumis à la purification présentée dans le Schéma # 4. De cette purification, nous avons obtenu un composé actif. Les analyses spectroscopiques ont conduit à identifier **C7** comme un alcool gras (C₃₇H₇₂O).

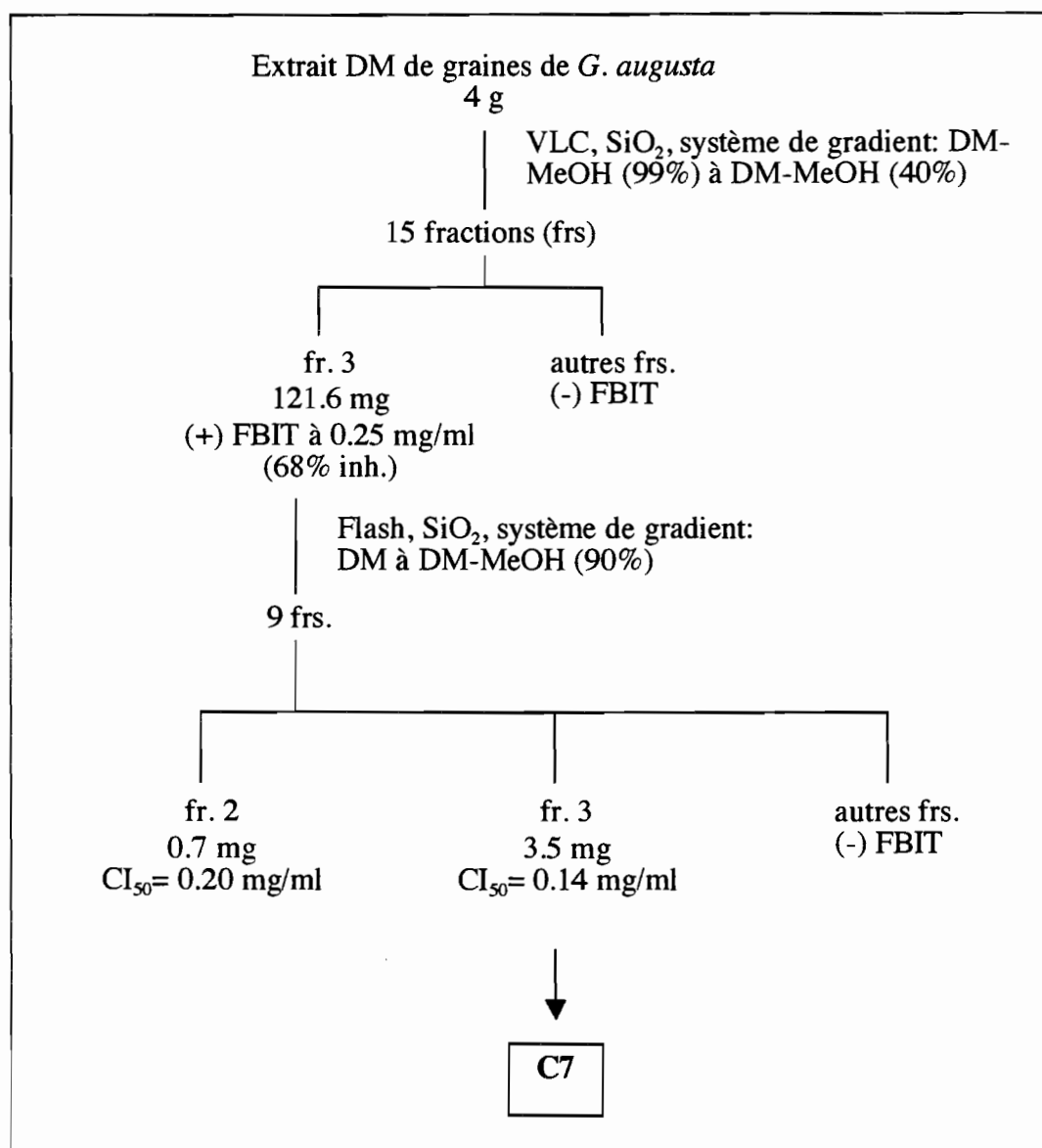


SCHÉMA # 4. Purification de l'extrait au dichlorométhane des graines de *Gustavia augusta*.

3. Identification d'inhibiteurs de FPIX en *Bowdichia virgiloides* (Leguminosae)

A. Information botanique

Bowdichia virgiloides est une Légumineuse rencontrée en Amérique du Sud et plus particulièrement en Bolivie. C'est un arbre touffu, au tronc droit, mesurant en moyenne 6 m de haut en Colombie et pouvant atteindre jusqu'à 45 m dans d'autres régions tropicales [Torrenegra et al., 1989]. Les feuilles sont imparipennées, constituées de 5 à 7 folioles oblongues, elles sont coriaces, petites et longues. Les fleurs, situées à l'extrémité des rameaux, se présentent en grappes rouges ou blanches. Leur corolle est caractéristique des Papilionacées. Le fruit est une gousse avec graines rouges, tachées de noir [Waikédre, 2000].

Caractères botaniques:

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Sous classe: Rosiidae

Ordre: Fabales

Famille: Papilionacées (Légumineuse)

Genre: *Bowdichia*

Espèce: *Bowdichia virgiloides* Kunth.

B. Information bibliographique

Bowdichia virgiloides est un arbre dont le bois s'utilise pour la construction et son écorce, appelée également *Cortex Alcornocco* o *Cortex Sebipira*, s'utilise dans la médecine traditionnelle pour combattre une grande variété des maladies qui incluent le soulagement des fièvres élevées dues au paludisme, le traitement des hémorragies, contre les diarrhées chroniques et pour la purification du sang [Torrenegra et al., 1985; Marinho et al., 1994]. Les graines sont utilisées dans le traitement du rhumatisme, de l'arthrite et des maladies de la peau. En Bolivie, cette plante s'utilise en décoctions contre la dysenterie et la malaria. Appliquée comme cataplasmes, elle est utile contre les blessures de la leishmaniose cutanée [Bravo et al., 2002a]. L'existence de triterpènes comme l'acide bétulinique, le lupéol ont été reportés de *B. virgiloides* [Marinho et al., 1994]. De même, on a décrit des alcaloïdes du type ormosia: l'ormosanine, l'hormoormosanine, l'homo-18-epiormosanine, la piptanthine, l'homopiptanthine et la podopétaline [Torrenegra et al., 1989]. Des essais antibactériens et antifongiques, ont été réalisés sans succès [Bravo et al. 2002a]. Les essais sur *P. falciparum in vitro* et sur *P. berghei in vivo* ont confirmé la valeur antipaludique de cette légumineuse [Muñoz et al. 2000]. La Figure # 22 présente les alcaloïdes isolés de *Bowdichia virgiloides*.

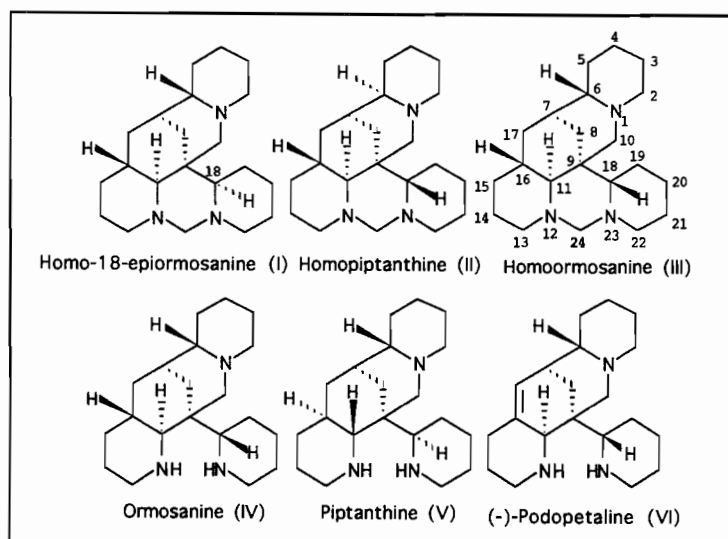


FIGURE # 22.- Alcaloïdes isolés de *Bowdichia virgiloides*.

C. Fractions de Bowdichia virgilioides

Six fractions provenant d'une séparation bioguidée de *Bowdichia virgilioides* m'ont été remises pour réaliser des études spectroscopiques. Les six fractions ont été travaillées par Jean Waikédré et collaborateurs en 2000 [Waikédré, 2000]. La CCM de ces fractions a été effectuée en plaques d'alumine d'activité constante. Le facteur principal déterminant l'activité étant la teneur en eau, il a été choisi d'utiliser dans ce travail des plaques d'alumine basique d'activité I, contenant 0% d'eau selon l'échelle de Brockman. Ces conditions nous ont permis d'obtenir des profils d'élution très reproductibles. Nous avons utilisé le système de solvants: acétate d'éthyle: méthanol 98:2 et 0.5% de DEA. Ce système de solvants donne une bonne séparation des alcaloïdes apolaires vis-à-vis des polaires. L'addition de la base organique: diéthylamine (DEA) au solvant d'élution améliore la migration des alcaloïdes et évite la formation de traînées.

Des 6 fractions remises, deux (C8 et C9) ont présentés un bon niveau de pureté permettant l'élucidation structurale. Grâce aux études spectroscopiques, le composé C8 a été identifié à l'homormosanine et le C9 à l'ormosanine.

PARTIE V

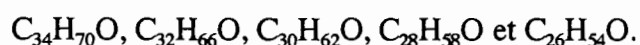
DETERMINATION DES STRUCTURES DES COMPOSES ACTIFS ISOLEES DES PLANTES ETUDIÉES

1. Composés actifs isolés de *Brachyotum microdon* (*Melastomataceae*)

Nous présentons dans ce chapitre le travail d'élucidation structurale de six composants actifs purifiés de *Brachyotum microdon*. Pour chacun d'entre eux, on détaille l'interprétation de résonance magnétique nucléaire (RMN), de spectrométrie de masse (SM) et où cela est nécessaire les spectres infra rouge (IR) et la mesure de la rotation spécifique ($[\alpha]_D$).

A. Composé C1: alcools gras

Le composé C1 se présente sous la forme d'un solide amorphe blanc. L'analyse des expériences de RMN et SM a permis l'établissement de sa structure qui correspond à un mélange d'alcools gras:



1. Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Le spectre de Résonance Magnétique du proton (1H -RMN) de C1 montre un triplet à 3.64 ppm correspondant à deux protons du type CH_2OH . En se déplaçant vers

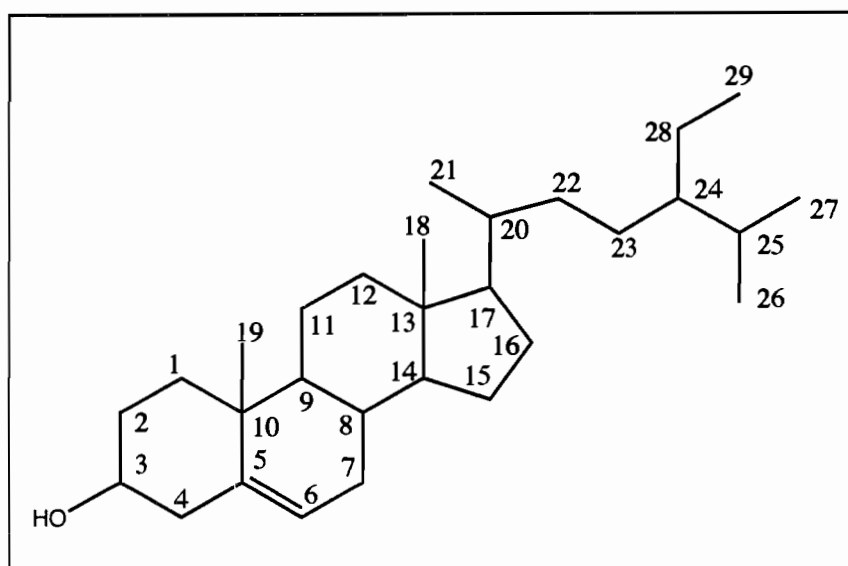
les champs forts, nous trouvons un multiplet à 1.59 ppm propre aux protons en β de l'hydroxyle ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$). Ce signal intègre pour 2 protons. À 1.25 ppm, on remarque un singulet intense correspondant à plusieurs méthylènes (CH_2). L'intégration pour ces protons est de 67 qui correspondrait au maximum à 34 CH_2 . Finalement, le signal plus blindé correspond à un CH_3 qui résonne à 0.88 ppm. Ce dernier signal intègre pour 3 protons. En résumé, le spectre de ^1H -RMN est celui d'un alcool gras par la présence de $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_3$ et un certain nombre de $-\text{CH}_2-$.

2. Données de Spectrométrie de Masse (SM)

Le spectre de masse par ionisation chimique directe (DCI) de C1 présente 4 pics importants à 512, 484, 456 et 428. La séparation entre ces pics est de 28 unités ce qui correspond à une différence d'un éthylène. On l'utilise comme plasma ionique NH_3 ; dès lors chaque pic correspond à MNH_4^+ , c'est-à-dire $\text{M}+18$. Le poids moléculaire de chaque alcool est de 494, 466, 438, 410 et 382. Grâce à ces données, le mélange des alcools gras serait: $\text{C}_{34}\text{H}_{70}\text{O}$, $\text{C}_{32}\text{H}_{66}\text{O}$, $\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}$, $\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{O}$ et $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}$. Ce mélange d'alcool gras est confirmé grâce au spectre d'ionisation électronique (IE). Les pics moléculaires observés en DCI ne sont pas détectés; cependant, le spectre IE présente les fragments attendus par la perte d' H_2O à partir de $[\text{M}]^+$. Ces ions sont détectés à m/z 476 pour $\text{C}_{34}\text{H}_{70}\text{O} - \text{H}_2\text{O}$, à 448 pour $\text{C}_{32}\text{H}_{66}\text{O} - \text{H}_2\text{O}$, à 420 pour $\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O} - \text{H}_2\text{O}$, à 392 pour $\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{O} - \text{H}_2\text{O}$ et à 364 pour $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O} - \text{H}_2\text{O}$.

B. Composé C2: β - sitostérol

Le composé C2 se présente sous la forme d'un solide amorphe blanc. L'analyse des expériences de RMN et SM a permis l'établissement de sa structure qui correspond au β - sitostérol:



1. Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

a) *Résonance Magnétique du proton* (^1H -RMN)

Le spectre montre un doublet à 5.35 ppm correspondant à un proton du type éthylénique (H-6). En se déplaçant vers les champs forts, nous rencontrons un multiplet à 3.51 ppm propre d'un proton uni à un alcool secondaire (H-3). Le doublet éthylénique présente un couplage de 4.6 Hz alors que le multiplet à 3.51 ppm correspond à un triplet de triplets avec des constantes de couplages de 11 et 4 Hz. Vers 1.1 ppm, dans la région des méthyles, on distingue plusieurs signaux intenses : deux singulets correspondent à deux méthyles angulaires à 1.01 et à 0.69 ppm (H-19 et H-18), trois doublets, à 0.93 ppm

(6.6. Hz, H-21), à 0.85 ppm (7.5 Hz, H-26) et 0.82 (6.8 Hz, H-27) et un triplet à 0.85 ppm (7.5 Hz, H-29).

b) Résonance Magnétique du carbone, J-MODulated spin-echo experiment (^{13}C -JMOD-RMN)

Le spectre de ^{13}C -JMOD-RMN montre dans la zone des -CH- et -CH₃, 15 signaux dont 6 correspondent aux méthyles. Dans la partie positive du spectre, où apparaissent les -CH₂- et les carbones quaternaires, on différencie 13 signaux. En comptant les signaux positifs et négatifs de notre spectre J-modulé du carbone, nous obtenons un total de 28 carbones.

c) Corrélation hétéronucléaire directe: Heteronuclear Simple Quantum Correlation (HSQC)

Le Tableau # 15 enferme les données de ^{13}C - JMOD-RMN et ses corrélations avec ^1H -RMN établies à l'aide du spectre HSQC.

Atome	Carbone [ppm]	Proton [ppm]	Group fonctionnel
18	12.0	0.69 (s)	CH ₃ -
29	12.0	0.85 (t, 7.5 Hz)	CH ₃ -CH ₂ -
21	19.0	0.93 (d, 6.6 Hz)	CH ₃ -CH-
27	19.2	0.82 (d, 6.8 Hz)	CH ₃ -CH-
19	19.6	1.01 (s)	CH ₃ -
26	20.0	0.85 (d, 7.5 Hz)	CH ₃ -CH-
11	21.0	1.51	-CH ₂ -
28	23.3	1.28 (f) ³	-CH ₂ -
15	24.5	1.60- 1.07	-CH ₂ -
23	26.3	1.18 (f) ³	-CH ₂ -
16	28.5	1.82- 1.27	-CH ₂ -
25	29.4	1.67	-CH-
2, 8, 7	32.0	1.92-1.51	2-CH ₂ -, -CH-
22	34.2	1.34- 1.03	-CH ₂ -
20	36.3	1.37	-CH-
10	37.0	PTC ¹	Cq ²
1	37.5	1.85- 1.08	-CH ₂ -
12	40.0	2.02- 1.17	-CH ₂ -
4	42.5	2.30	-CH ₂ -
24	46.0	0.93	-CH-
9	50.3	0.93	-CH-
17	56.3	1.12	-CH-
14	57.0	1.01	-CH-
3	71.9	3.51 (t t, 11.0, 4.0 Hz)	-CH-OH
6	121.9	5.35 (d, 4.6 Hz)	-C=CH-
5	140.0	-	-C=CH-

¹: PTC: Pas de tache de corrélation ²: Cq: Carbone quaternaires ³: f: tache faible

TABLEAU # 15. Assignations de carbones et protons moyennant HSQC en C2 (400 MHz, CDCl₃).

Des résultats présentés dans le Tableau # 15, nous pouvons conclure que la molécule possède 6 -CH₃, 9 -CH-, 11 -CH₂- et 2 Cq (carbones quaternaires). Si notre molécule est un stérol commun (29 carbones), nous avons besoin de 6 -CH₃, 11 -CH₂-, 9 -CH- et 3 Cq. Pour arriver à la structure de ce stérol, le carbone qui manquerait serait un Cq qui résonnerait avec un -CH₂- ou un Cq déjà désigné.

d) Corrélations hétéronucléaires et homonucléaires scalaires:

Heteronuclear Multiple- Bound Correlation (HMBC) et

Correlated Spectroscopy (COSY)

Une caractéristique présente dans les terpénoïdes et qui est utile dans le choix du squelette stéroïdique ou triperpénique est le nombre de CH₃ présents dans la molécule. Grâce aux taches de corrélations que l'on obtient en partant de ces centres méthyliques (CH₃), nous pouvons connecter de grandes pièces du puzzle de la molécule terpénique.

Les tableaux # 16 et 17 présentent respectivement des corrélations provenant du HMBC et COSY du composant C2. En utilisant ces corrélations, la structure de trois fragments du puzzle peut être établie.

Atome	Proton [ppm]	Corrélation a ² J [ppm]	Corrélation a ³ J [ppm]
18	0.69 (s)	42.5 (C-4)	40.0 (C-12) 56.3 (C-17) 57.0 (C-14)
27	0.82 (d)	29.4 (C-25)	20.0 (C-26) 46.0 (C-24)
26	0.85 (d)	29.4 (C-25)	19.2 (C-27) 46.0 (C-24)
29	0.85 (t)	23.3 (C-28)	46.0 (C-24)
21	0.93 (d)	36.3 (C-20)	34.2 (C-22) 56.3 (C-17)
19	1.01 (s)	37.0 (C-10)	37.5 (C-1) 50.3 (C-9) 140.0 (C-5)
28 ¹	1.28	-	29.4 (C-25)

¹: Signal qui correspondent à -CH₂-

TABLEAU # 16. Corrélations hétéronucléaires provenant d'HMBC du composé C2 (400 MHz, CDCl₃).

Atome	Proton [ppm]	Corrélation a ¹ J [ppm]
2	1.92- 1.51	1.85- 1.08 (H-1) 3.51 (H-3)
1	1.85- 1.08	1.92- 1.51 (H-2)
3	3.51 (t,t)	1.92- 1.51 (H-2) 2.30 (H-4)
4	2.30	3.51 (H-3)
6	5.35 (d)	1.51- 1.92 (H-7)
7	1.51- 1.92	5.35 (H-6)
12	2.02- 1.17	1.51 (H-11)
11	1.51	2.02- 1.17 (H-12)
21	0.93	1.37 (H-20)
20	1.37	0.93 (H-21)
29	0.85	1.28 (H-28)
28	1.28	0.85 (H-29)
27	0.82	1.67 (H-25)
25	1.67	0.82 (H-27) 0.85 (H-26)
26	0.85	1.67 (H-25)

TABLEAU # 17. Corrélations homonucléaires provenant du spectre COSY du composé C2 (400 MHz, CDCl₃).

Le premier fragment, fragment A, est construit à partir du méthyle à 1.01 ppm (H-19) lequel présente des corrélations en HMBC avec les signaux à 37.0 ppm (C-10), 50.3 ppm (C-9), 37.5 ppm (C-1) et 140.0 (C-5). De même, les protons du signal à 37.5 ppm (1.85- 1.08 ppm; H-1) présentent une corrélation COSY avec les protons à 1.51- 1.92 ppm (H-2), lesquels couplent avec le proton à 3.51 ppm (H-3). Finalement, ce proton uni à l'alcool secondaire (H-3) couple avec les protons à 2.30 ppm (H-4). Pour compléter la structure de ce fragment, le carbone à 140.0 ppm (C-5) possède un déplacement typique d'un carbone quaternaire éthylénique. En conséquence, ce dernier sera uni au carbone que porte le proton éthylénique, (121.9 ppm, 5.35 ppm, H-6). Avec ces données, on peut tracer le fragment A présenté dans la Figure # 23 (les corrélations

de l'expérience HMBC sont représentées avec des flèches foncées et celles de l'expérience COSY avec des flèches claires).

Le fragment B résulte des corrélations provenant des méthyles à 0.69 ppm (H-18) et 0.93 ppm (H-21). Le proton en 0.69 (H-18) ppm est en corrélation avec les carbones à 42.5 ppm (C-13), 57.0 ppm (C-14), 56.3 ppm (C-17) et 40.0 ppm (C-12). Le spectre COSY nous indique que les protons du carbone à 40.0 ppm (2.02- 1.17 ppm; H-12) sont en corrélation avec ceux à 1.51 ppm (H-11). Le proton à 0.93 ppm (H-21), est de même en corrélation avec les carbones à 36.3 (C-20), 34.2 (C-22) et 56.3 ppm (C-17). Grâce à la corrélation du carbone à 56.3 ppm (C-17) avec les deux protons 0.93 ppm (H-21) et 0.69 ppm (H-18) nous pouvons réunir les informations précédentes et former le fragment B, Figure # 23.

Le dernier fragment résulte des corrélations des méthyles à 0.82 ppm (H-27) et 0.85 ppm (H-26). Tous deux couplent en HMBC avec le carbone à 46.0 (C-24) et en COSY avec le proton en 1.67 ppm (H-25). Ce fragment C est présenté à la Figure # 23.

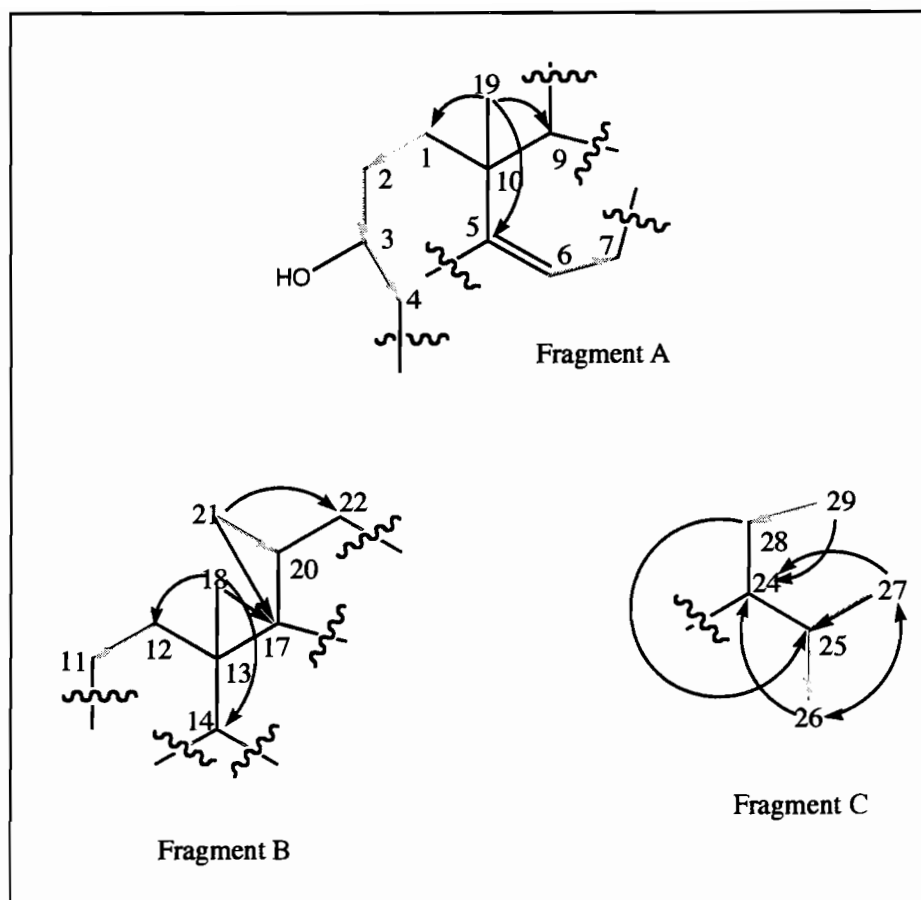


FIGURE # 23. Fragments obtenus moyennant l'analyse des spectres de HMBC et COSY de C2.

Grâce aux données obtenues des corrélations des spectres HMBC et COSY, la structure du composé **C2** semble être celle du β -sitostérol. Le Tableau # 18 présente la comparaison des données expérimentales et théoriques de RMN.

Atome	¹ H-RMN [ppm] ¹ C2	¹³ C-RMN [ppm] ¹ C2	¹ H-RMN [ppm] β-sitosterol ^{1,2}	¹³ C-RMN [ppm] β-sitosterol ^{1,2}
18	0.69 (s)	12.0	0.69 (s)	11.9
29	0.85 (t, 7.5 Hz)	12.0	0.85 (t, 6 Hz)	12.0
21	0.93 (d, 6.6 Hz)	19.0	0.94 (d, 6.6 Hz)	18.8
27	0.82 (d, 6.8)	19.2	0.81 (d, 6 Hz)	19.0
19	1.01 (s)	19.6	1.01 (s)	19.4
26	0.85 (d, 7.5 Hz)	20.0	0.84 (d, 6 Hz)	19.8
11	1.51 (m)	21.0	1.48 (m)	21.1
28	1.28 (m)	23.3	1.25 (m)	23.1
15	1.60- 1.07	24.5	1.58 (m), 1.08 (m)	24.3
23	1.18 (m)	26.3	1.15 (m)	26.1
16	1.82- 1.27	28.5	1.29 (m), 1.86 (m)	28.2
25	1.67 (m)	29.4	1.68 (m)	29.2
2	1.92-1.51 (m)	32.0	1.54 (m), 1.85 (m)	31.7
8	1.92-1.51 (m)	32.0	1.93	31.8
7	1.92-1.51 (m)	32.0	1.98 (m), 1.53 (m)	31.9
22	1.34- 1.03	34.2	1.03 (m), 1.30 (m)	34.0
20	1.37 (m)	36.3	1.32 (m)	36.1
10	-	37.0	-	36.5
1	1.85- 1.08 (m)	37.5	1.10 (m), 1.85 (m)	37.3
12	2.02- 1.17 (m)	40.0	1.19 (m), 1.99 (m)	39.8
4	2.30 (m)	42.5	2.27 (m)	42.3
13	-	42.5	-	42.3
24	0.93 (m)	46.0	0.93 (m)	45.9
9	0.93 (m)	50.3	0.95 (m)	50.1
17	1.12 (m)	56.3	1.09 (m)	56.1
14	1.01 (m)	57.0	0.98 (m)	56.8
3	3.51 (t,t, 11, 4 Hz)	71.9	3.53 (t,t, 11, 4Hz)	71.8
6	5.35 (d, 4.6 Hz)	121.9	5.36 (d, 5 Hz)	121.7
5	-	140.0	-	140.8

¹: CDCl₃

²:Bravo et al., 2002b.

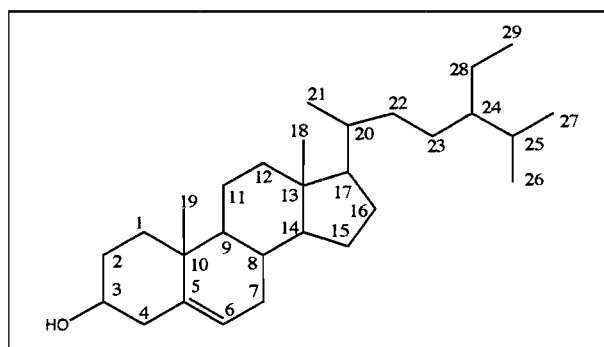


TABLEAU # 18. Comparaison de données de ¹H-RMN y ¹³C-RMN du composé C2 et celles reportées pour le β-sitostérol.

2. Données de spectrométrie de Masses (EM)

a) Impact Electronique (IE)

Nous présentons maintenant l'analyse du spectre de masse d'Impact Electronique (IE) de **C2**. Le spectre présente l'ion moléculaire $m/z = 414$ qui correspond à une formule moléculaire de $C_{29}H_{50}O$ avec un degré d'insaturation de 4. L'ion à m/z 396 présente le comportement d'une fonction alcoolique moyennant la perte d'une molécule d'eau, ($M^+ - H_2O$). Postérieurement, nous pouvons observer la perte d'un méthyle à m/z 381 ($M^+ - H_2O - CH_3$). Le signe à m/z 274 ($M^+ - C_9H_{14}O - H_2$) provient d'une rupture de cycle B par un mécanisme de rétro-Diels Alder. La Figure # 24 présente les fragments observés de l'ionisation électronique de **C2**.

b) Ionisation chimique directe (DCI)

Le spectre de DCI, confirme l'existence de l'ion moléculaire de **C2** à m/z 414. Dans ce spectre, on observe le signe à m/z 432 correspondant à l'ion moléculaire plus le gaz ioniseur utilisé (NH_3). On observe également le signe à m/z 397 provenant de la perte d'une molécule d'eau.

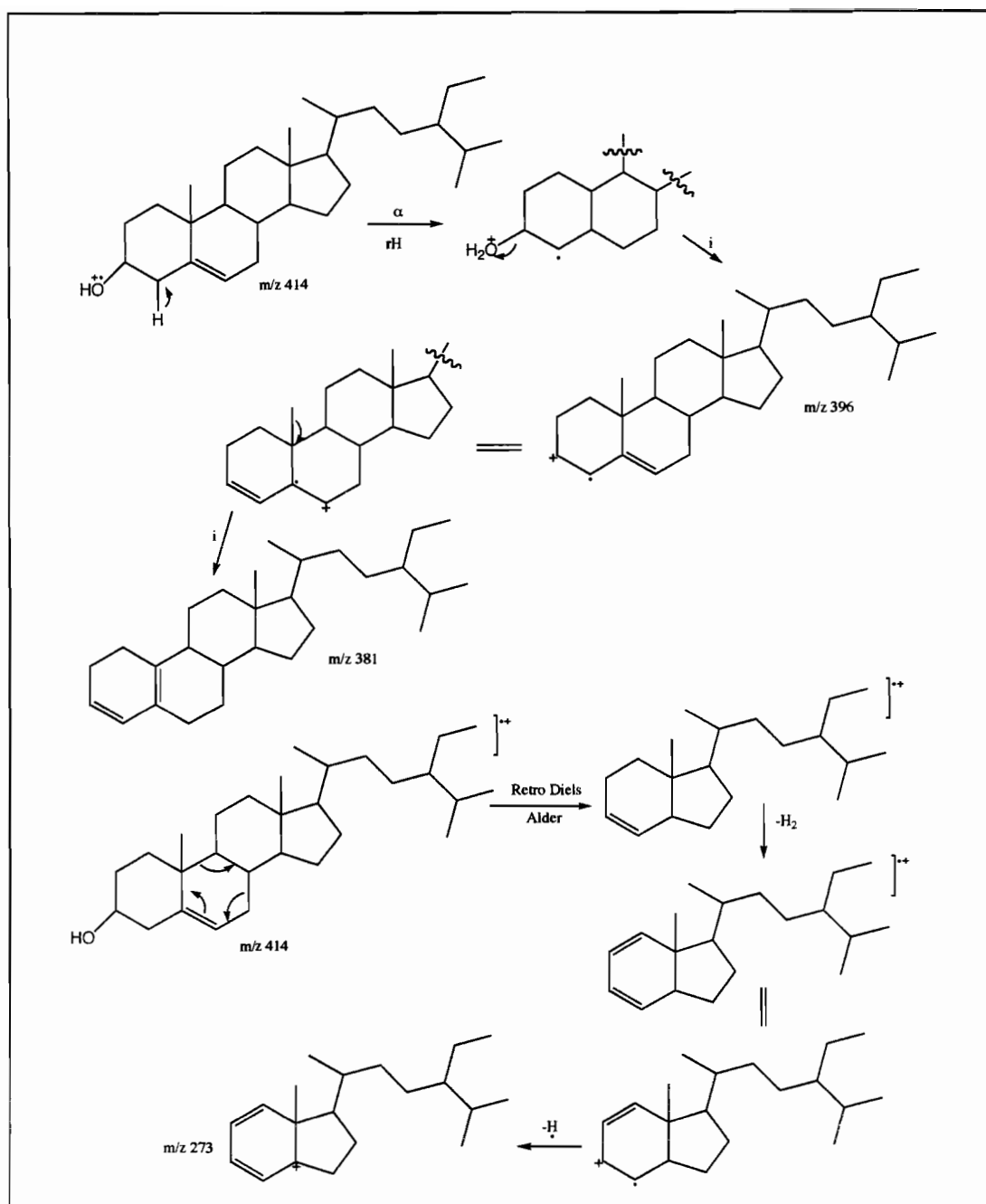
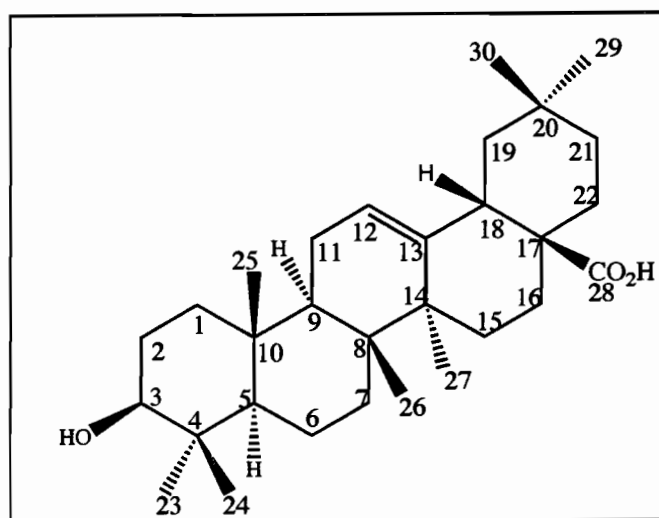


FIGURE # 24. Fragments observés en EI de C2.

Conclusion: le composant **C2** est le β -sitostérol . Cette identification est basée sur les données de spectrométrie que nous avons obtenu, la comparaison des données obtenues expérimentalement avec celles de la bibliographie et la comparaison des propriétés physiques avec une référence, à savoir l'identité chromatographique ($R_f = 0.15$, AcOEt: CH_2Cl_2 3%) et le point de fusion (p.f. $137^\circ C$).

C.Composé C3: Acide oléanolique

Le composé **C3** se présente sous la forme d'un solide blanc. L'analyse des expériences de RMN et SM a permis l'établissement de sa structure qui correspond à l'acide oléanolique:



1. Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

a) Résonance Magnétique du proton (¹H-RMN)

L'observation de sept singulets entre 1.16 et 0.77 ppm, dans le spectre de ¹H-RMN indique la présence de sept groupes méthyliques isolés placés sur des carbones quaternaires ou des méthyles angulaires en jonction de cycles d'un triterpène. En nous déplaçant vers les champs faibles, nous observons un doublet pour un proton très déblindé à 2.83 ppm (1H, d, 11 Hz, H-18). Un autre doublet est observé pour un proton porté par un carbone oxygéné à 3.23 ppm (1H, d, 11 Hz, H-3). Le dernier signal à 5.31 ppm (1H, dd, 7.5, 2.5 Hz, H-12) constitue le méthine d'un système éthylénique.

b) Résonance Magnétique du carbone, J-MODulated spin-echo experiment (^{13}C -JMOD-RMN)

Le spectre de ^{13}C -JMOD-RMN montre dans la zone des $-\text{CH}-$ et $-\text{CH}_3$, 12 signaux dont 7 correspondent aux méthyles. Dans la partie positive du spectre, où apparaissent les $-\text{CH}_2-$ et les carbones quaternaires, on différencie 18 signaux. En additionnant les signaux positifs et négatifs de notre spectre J-modulé, nous obtenons 30 carbones. La présence de 7 singulets dans la région des méthyles, issue des données du spectre de proton, et les 30 carbones enregistrés dans le spectre de carbone, permettent de proposer une structure triterpénique pour **C3** avec 7 méthylènes angulaires. D'autres données importantes sont le signal à 79.0 ppm correspondant à un CH oxygéné (C-3), le signal à 122.7 ppm correspondant à un CH insaturé (C-12), le signal à 143.6 ppm typique d'un carbone quaternaire insaturé (C-13) et celui à 182.4 ppm, qui correspond à un carbonyle uni à un carbone tertiaire ou quaternaire (C-28).

c) Corrélation hétéronucléaire directe: Heteronuclear Simple Quantum Correlation (HSQC)

Le Tableau # 19 présente les données de ^{13}C - JMOD-RMN et ses corrélations avec le spectre de ^1H -RMN moyennant le HSQC.

Atome	Carbone [ppm]	Proton [ppm]	Groupe fonctionnel
25	15.3	0.94 (s)	CH ₃ -
24	15.6	0.80 (s)	CH ₃ -
26	17.1	0.77 (s)	CH ₃ -
6	18.3	1.40 ¹ (ddd, 12.8, 12.5, 12.2 Hz) 1.56 ² (dd, 10.8, 5.6 Hz)	-CH ₂ -
16	23.0	2.00 ¹ (ddd, 15, 15, 3.5 Hz) 1.61 ² (m)	-CH ₂ -
11	23.4	1.90 ² (dd, 14, 3Hz) 0.94 ^{1,3}	-CH ₂ -
30	23.6	0.96 (s)	CH ₃ -
27	25.9	1.16 (s)	CH ₃ -
2	27.2	1.63 ¹ (m) 1.57 ² (ddd, 12.6, 5.6, 5.6 Hz)	-CH ₂ -
15	27.7	1.09 ² (m) 1.72 ¹ (ddd, 15, 15, 3.5 Hz)	-CH ₂ -
23	28.1	1.01 (s)	CH ₃ -
20	30.7	-	Cq ⁴
22	32.4	1.60 ² (d, 15 Hz) 1.77 ¹ (ddd, 15, 15, 4 Hz)	-CH ₂ -
7	32.6	1.32 ¹ (dd, 15, 9.5 Hz) 1.44 ² (d, 11 Hz)	-CH ₂ -
29	33.1	0.93 (s)	CH ₃ -
21	33.8	1.36 ¹ (dd, 9.5, 9.5 Hz) 1.22 ² (d, 9.5 Hz))	-CH ₂ -
10	37.1	-	Cq ⁴

¹: Proton en position axiale (x). Dans quelques cas, on observe nettement un triplet comme tache de corrélation en HSQC pour les couplages J_{gem}, _{xx}.

²: Proton en position équatoriale (q). Dans quelques cas, on observe un doublet comme tache de corrélation en HSQC pour les couplages J_{gem}.

³: Sous le signal du H-30.

⁴: Cq: carbone quaternaire

TABLEAU # 19. Assignment des carbones et protons de C3 à l'aide du spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃).

Atome	Carbone [ppm]	Proton [ppm]	Groupe fonctionnel
1	38.4	1.62 ^{2,3} 1.00 ¹ (dd, 8.0, 8.3 Hz)	-CH ₂ -
4	38.8	-	Cq ⁴
8	39.3	-	Cq ⁴
18	41.1	2.83 ¹ (d, 11 Hz)	-CH-
14	41.6	-	Cq ⁴
19	45.9	1.63 ¹ (dd, 13, 12 Hz) 1.16 ^{2,5} (d, 13.5 Hz))	-CH ₂ -
17	46.5	-	Cq ⁴
9	47.6	1.57 ¹ (dd, 10.5, 9 Hz)	-CH-
5	55.2	0.76 ¹ (d, 11.5 Hz)	-CH-
3	79.0	3.23 (d, 11 Hz)	-CH-
12	122.7	5.31 (dd, 5, 2.5 Hz)	-CH-
13	143.6	-	Cq ⁴
28	182.4	-	Cq ⁴

¹: Proton en position axiale (x). Dans quelques cas, on observe nettement un triplet comme tache de corrélation en HSQC pour les couplages $J_{gem, xx}$.

²: Proton en position équatoriale (q). Dans quelques cas, on observe un doublet comme tache de corrélation en HSQC pour les couplages J_{gem} .

³: Sous le signal du H-19.

⁴: Cq: carbone quaternaire.

⁵: Sous le signal du H-27.

TABLEAU # 19. Suite. Assignment des carbones et protons de C3 à l'aide du spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃).

d) Corrélations hétéronucléaires et homonucléaires scalaires:

Heteronuclear Multiple- Bound Correlation (HMBC) et

Correlated Spectroscopy (COSY)

Les corrélations de HMBC et COSY du composé **C3** sont respectivement résumées dans les Tableaux # 20 et # 21. Les corrélations les plus importantes (Figure # 25) sont présentées à la suite. Dans la figure # 25, on note par des flèches foncées les corrélations observées sur le spectre HMBC et en claire celles du spectre COSY.

Atome	Carbone [ppm]	Corrélation à 2J [ppm]	Corrélation à 3J [ppm]	Corrélation à 4J [ppm]
28	182.4		2.83 (H-18)	
13	143.6	5.31 (H-12) 2.83 (H-18)	1.77 (H-22) 1.90 (H-11) 1.63 (H-19) 1.16 (H-27)	
12	122.7	1.90 ¹ (H-11)	2.83 (H-18)	
3	79.0		1.62 (H-1) 1.01 (H-23) 0.80 (H-24)	
5	55.2	1.56 (H-6)	1.01 (H-23) 0.94 (H-25) 0.80 (H-24) 1.62 (H-1) 1.44 (H-7)	
9	47.6		5.31 (H-12) 0.94 (H-25) 0.77 (H-26) 0.76 (H-5)	1.16 (H-27)
17	46.5	2.00 (H-16) 1.77 (H-22) 1.60 (H-22)	1.16 (H-19)	
19	45.9	2.83 (H-18)	0.96 (H-30) 0.93 (H-29)	5.31 (H-12)
14	41.6	1.72 (H-15) 1.16 (H-27)	2.83 (H-18) 1.57 (H-9) 0.77 (H-26)	
18	41.1	1.63 (H-19)	2.00 (H-16)	
8	39.3	0.77 (H-26)	1.90 (H-11) 1.72 (H-15) 1.56 (H-6) 1.16 (H-27)	
4	38.8	1.01 (H-23) 0.80 (H-24) 3.23 ¹ (H-3)		
1	38.4	1.63 (H-2) ¹		
10	37.1	1.62 (H-1)	1.56 (H-6) 1.90 (H-11)	
21	33.8	1.77 (H-22)	0.93 (H-29)	

¹: Tache faible

TABLEAU # 20. Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre HMBC de C3 (500 MHz, CDCl₃).

Atome	Carbone [ppm]	Corrélation à 2J [ppm]	Corrélation à 3J [ppm]	Corrélation à 4J [ppm]
29	33.1		1.63 (H-19) 0.96 (H-30) ¹ 1.36 (H-21)	
7	32.6		0.77 (H-26) 0.76 (H-5)	
20	30.7	1.63 (H-19) 0.96 (H-30) 0.93 (H-29)	1.77 (H-22) 1.60 (H-22)	
23	28.1		0.80 (H-24) 3.23 (H-3) 0.76 (H-5)	
15	27.7	2.00 (H-16)	1.16 (H-27)	
2	27.2	1.62 (H-1)		
27	25.9			5.31(H-12)
30	23.6		0.93 (H-29) 1.36 (H-21)	
11	23.4	5.31 (H-12)		
16	23.0	1.72 (H-15)	2.83 (H-18) 1.77 (H-22)	
26	17.1		1.57 (H-9)	1.56(H-6)
24	15.6		1.01 (H-23) 3.23 (H-3)	1.56 (H-6)

¹: Tache faible

TABLEAU # 20. Suite. Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre HMBC de C3 (500 MHz, CDCl₃).

Atome	Proton [ppm]	Corrélation à 1J [ppm], (Atome)
18	2.83x	1.63x 1.16q (H-19)
19	1.63x	1.16q (H-19)
	1.16q	1.63x (H-19)
22	1.60q	1.77x (H-22) 1.22q, 1.36x (H-21)
	1.77x	1.60q (H-22) 1.22q, 1.36x (H-21)
21	1.22q	1.36x (H-21)
	1.36x	1.22q (H-21)
1	1.00q	1.62x (H-1) 1.63x, 1.57q (H-2)
	1.62x	1.00q (H-1) 1.63x, 1.57q (H-2)
2	1.63x	1.57q (H-2) 3.23x (H-3)
	1.57q	1.63x (H-2) 3.23x (H-3)
6	1.40x	1.56q (H-6) 0.76x (H-5) 1.32x (H-7)
	1.56q	1.40x (H-6) 0.76x (H-5) 1.32x (H-7)
7	1.32x	1.44q (H-7)
	1.44q	1.32x (H-7)
16	1.61q	2.00x (H-16) 1.09q (H-15)
	2.00x	1.61q (H-16) 1.09q, 1.72x (H-15)
12	5.31	1.90q (H-11)
3	3.23x	1.63q (H-2)
18	2.83x	1.16q, 1.63x (H-19)

x: axial q: equatorial

TABLEAU # 21. Corrélations homonucléaires provenant du spectre COSY de C3 (500 MHz, $CDCl_3$).

En partant du signal du carbone oxygéné (79.0 ppm, C-3), on observe en HMBC les corrélations avec les protons 1.01 ppm (H-23), 0.80 ppm (H-24) et 1.62 ppm (H-1). De même, le proton à 1.62 ppm (H-1) présente en HMBC la corrélation avec le carbone à 37.1 ppm (C-10) et le COSY nous donne les corrélations avec les protons à 1.63 et 1.57 ppm (H-2). Ces derniers protons couplent avec le proton à 3.23 ppm (H-3). En suivant l'ordre d'enchaînement des atomes, les carbones à 28.1 ppm (C-23) et 15.6 ppm (C-24) corrélient avec le proton $-CH-$ plus blindé (0.76 ppm, H-5). Le carbone à 55.2 (C-5) couple avec le méthyle à 0.94 ppm (H-25) et avec le proton à 1.56 ppm (H-6). Finalement, le proton à 1.56 ppm (H-6) couple moyennant le spectre COSY avec les protons 1.32 et 1.44 ppm (H-7). Dans l'analyse présentée jusqu'ici, on remarque que sur le cycle qui porte l'alcool ou cycle A, se trouve également les méthyles 23, 24 et qu'ils sont proche du méthyle 25. Ce premier fragment, appelé fragment A, est dessiné dans la Figure # 25.

Le carbone quaternaire insaturé à 143.6 ppm (C-13) présente en HMBC des corrélations avec le méthyle à 1.16 ppm (H-27), avec le $-CH-$ insaturé (5.31 ppm, H-12), avec les protons à 1.63 ppm (H-19) et à 1.90 (H-11). Ce dernier proton présente dans le COSY des couplages avec le proton à 1.57 ppm (H-9) et à 5.31 ppm (H-12). En revenant au signal à 1.16 ppm (H-27), il est en corrélation avec le carbone à 41.6 ppm (C-14). De même le carbone (C-14) présente en HMBC une corrélation avec le méthyle à 0.77 ppm (H-26) et au $-CH-$ à 2.83 (H-18). Le carbone correspondant au proton à 2.83 ppm (41.1 ppm, C-18) est en corrélation avec le proton à 2.00 ppm (H-16). Les protons à 1.61- 2.00 ppm (H-16) présentent des couplages en COSY avec les protons à 1.09 et 1.72 ppm (H-15). De plus, ces derniers protons présentent en HMBC une corrélation avec le carbone quaternaire à 39.3 ppm (C-8). Pour finaliser la description de ce

deuxième fragment ou fragment B, le carbone à 39.3 ppm (C-8) corrèle avec les protons à 1.90 ppm (H-11). La Figure # 25 présente ce fragment B.

Pour définir le dernier fragment, nous indiquons que les protons à 1.63 et 1.16 ppm (H-19) présentent sur le spectre COSY un couplage avec le proton –CH– à 2.83 ppm (H-18). Le carbone à 45.9 ppm (C-19) corrèle également en HMBC avec les CH₃ à 0.96 ppm (H-30) et à 0.93 ppm (H-29). En repartant du signal à 2.83 ppm (H-18), ce dernier présente dans le spectre HMBC des corrélations avec le carbone acide (182.4 ppm, C-28). De même, le carbone à 182.4 ppm (C-28) corrèle avec le proton à 1.77 ppm (H-22). Ce dernier couple sur le spectre COSY avec les protons 1.36 et 1.22 ppm (H-21). Le carbone qui porte ces derniers protons 33.8 ppm (C-21) présente une corrélation (spectre HMBC) avec le méthyle à 0.93 ppm (H-29). La Figure # 25 présente ce fragment C.

L'union des trois fragments A, B, C est faite grâce aux corrélations en HMBC du carbone à 47.6 ppm (C-9) au méthyle à 0.94 (H-25), du carbone quaternaire insaturé à 143.6 ppm (C-13) au proton à 1.63 ppm (H-19) et du carbone à 23.0 ppm (C-16) au proton à 1.77 ppm (H-22). La Figure # 25 aussi montre ces dernières corrélations qui permettent arriver à la structure du triterpène.

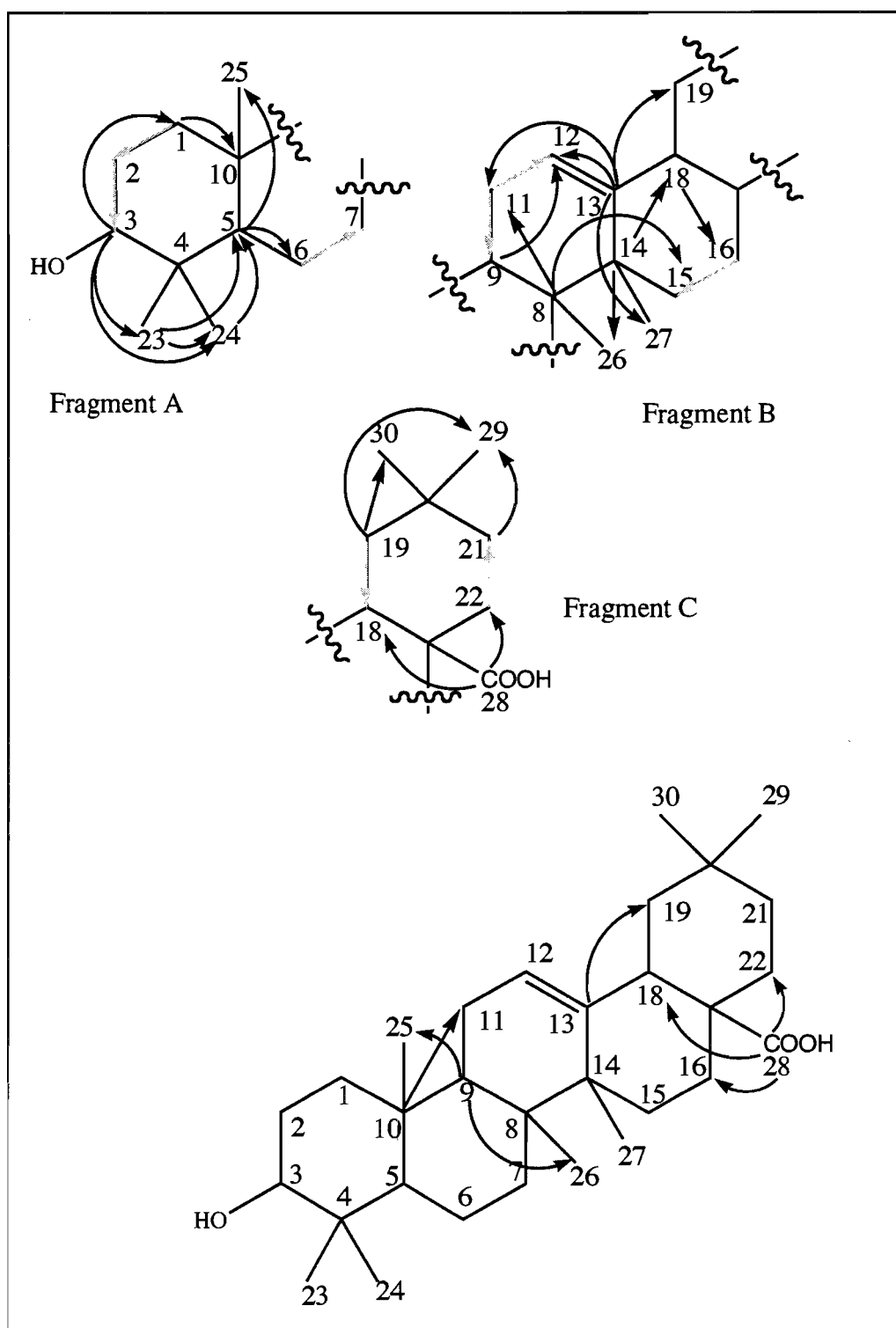


FIGURE # 25. Corrélations représentatives du composé C3 (HMBC, COSY).

Grâce à l'information obtenue dans les spectres de 1 et 2 dimensions, nous concluons que le composant **C3** correspond au 3 β -hydroxyléan-12-en-28-oïque acide ou acide oléanolique. Suite à cette analyse, nous présentons dans la Figure # 26, différentes représentations de la structure tridimensionnelle de **C3**. Le Tableau # 22 présente une comparaison entre les données spectroscopiques de **C3** et celles de l'oléanolate de méthyle publiées [Tori et al., 1974]. Nous avons utilisé comme référence l'oléanolate de méthyle parce que le spectre du ^{13}C -RMN a été mesuré dans le même solvant que celui de **C3**.

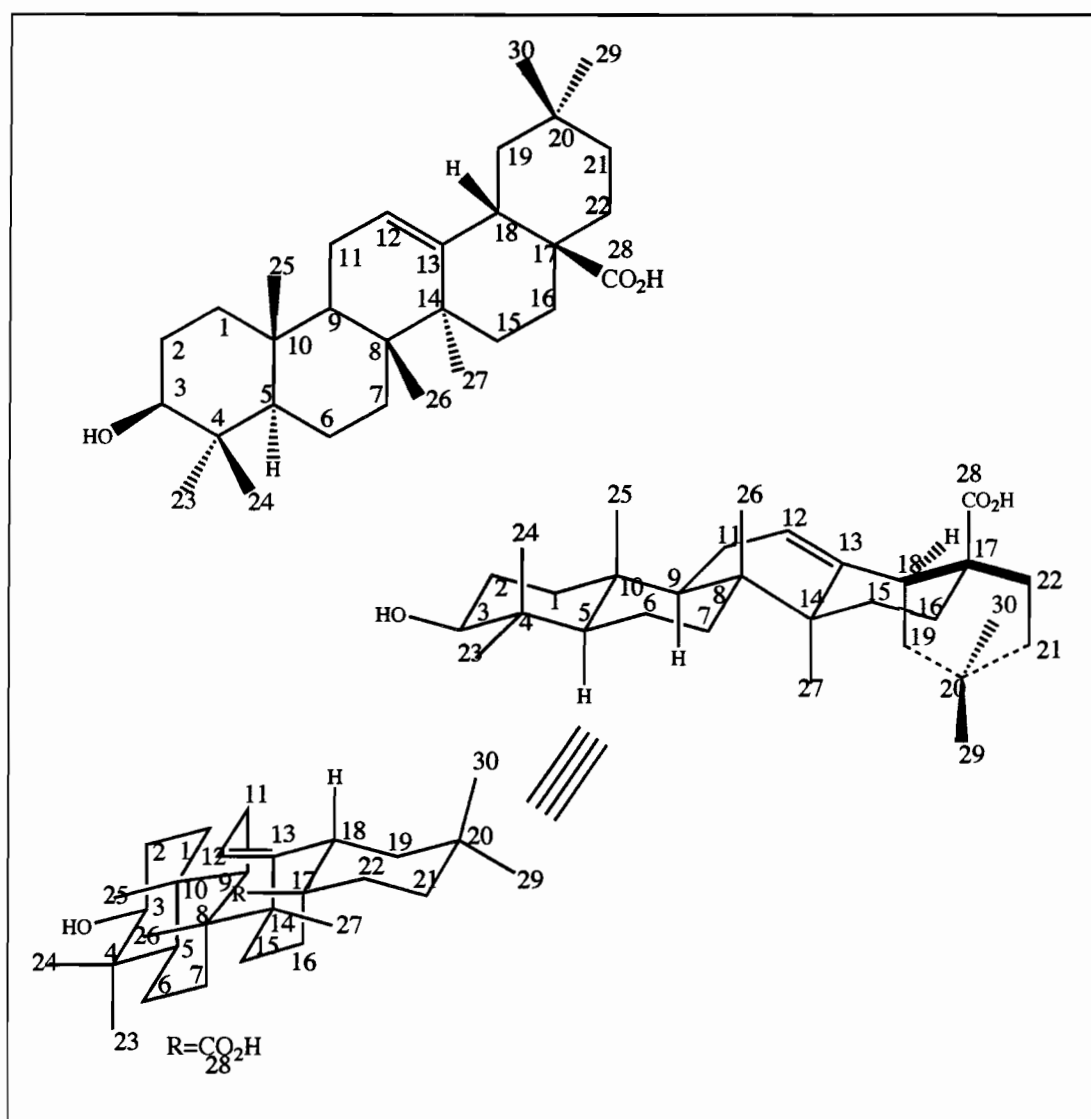


FIGURE # 26. Représentation des différentes structures tridimensionnelles de C3.

Atome	¹ H-RMN [ppm] C3 ³	¹³ C-RMN [ppm] C3 ³	¹³ C-RMN [ppm] oléanolate de méthyle ^{3,4}
25	0.94 (s)	15.3	15.3
24	0.80 (s)	15.6	15.6
26	0.77 (s)	17.1	16.8
6	1.40 ¹ (ddd, 12.8, 12.5, 12.2 Hz) 1.56 ² (dd, 10.8, 5.6 Hz)	18.3	18.3
16	2.00 ¹ (ddd, 15, 15, 3.5 Hz) 1.61 ² (m)	23.0	23.4
11	1.90 ² (dd, 14, 3Hz) 0.94 ^{1,3}	23.4	23.1
30	0.96 (s)	23.6	23.6
27	1.16 (s)	25.9	26.0
2	1.63 ¹ (m) 1.57 ² (ddd, 12.6, 5.6, 5.6 Hz)	27.2	27.1
15	1.09 ² (m) 1.72 ¹ (ddd, 15, 15, 3.5 Hz)	27.7	27.7
23	1.01 (s)	28.1	28.1
20	-	30.7	30.6
22	1.60 ² (d, 15 Hz) 1.77 ¹ (ddd, 15, 15, 4 Hz)	32.4	32.3
7	1.32 ¹ (dd, 15, 9.5 Hz) 1.44 ² (d, 11 Hz)	32.6	32.6
29	0.93 (s)	33.1	33.1

¹: proton axial ²: proton équatorial ³:CDCl₃ ⁴:Tori et al., 1974.

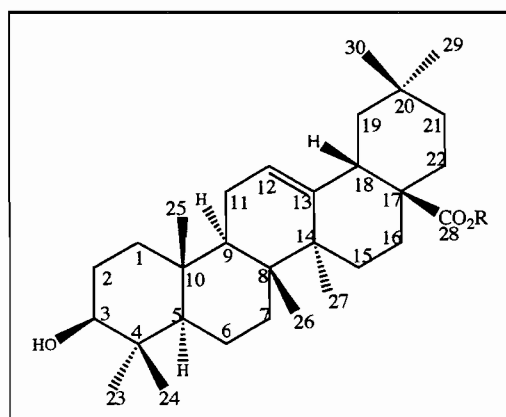


TABLEAU # 22. Comparaison des données expérimentales de ¹³C-RMN de C3 et de l'oleanolate de méthyle.

Atome	¹ H-RMN [ppm] C3 ³	¹³ C-RMN [ppm] C3 ³	¹³ C-RMN [ppm] oléanolate de méthyle ^{3,4}
21	1.36 ¹ (dd, 9.5, 9.5 Hz) 1.22 ² (d, 9.5 Hz))	33.8	33.8
10	-	37.1	37.0
1	1.62 ^{2,3} 1.00 ¹ (dd, 8.0, 8.3 Hz)	38.4	38.5
4	-	38.8	38.7
8	-	39.3	39.3
18	2.83 ¹ (dd, 11 Hz)	41.1	41.3
14	-	41.6	41.6
19	1.63 ¹ (dd, 13, 12 Hz) 1.16 ^{2,5} (d, 13.5 Hz))	45.9	45.8
17	-	46.5	46.6
9	1.57 ¹ (dd, 10.5, 9 Hz)	47.6	47.6
5	0.76 ¹ (d, 11.5 Hz)	55.2	55.2
3	3.23 (dd, 11 hz)	79.0	78.7
12	5.31 (dd, 5, 2.5 Hz)	122.7	122.1
13	-	143.6	143.4
28	-	182.4	177.9

¹: proton axial ²: proton équatorial ³:CDCl₃ ⁴: Tori et al., 1974.

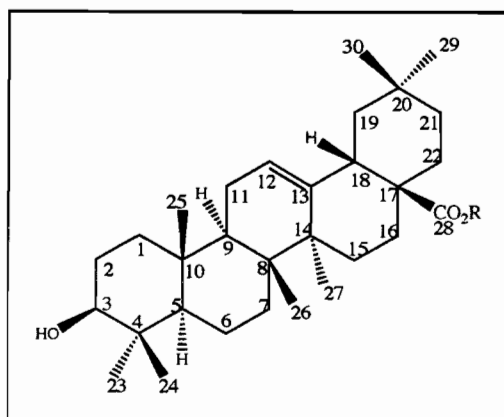


TABLEAU # 22. Comparaison des données expérimentales de ¹³C-RMN de C3 et de l'oleanolate de méthyle.

2. Données de la spectrométrie de masse (EM)

a) Ionisation chimique directe (DCI)

Le spectre de DCI présente un ion à $m/z = 474$, correspondant à l'ion moléculaire plus le gaz d'ionisation (NH_3). L'ion moléculaire apparaît à $m/z = 456$ et à partir duquel une fragmentation du type rétro Diels Alder, génère les ions à $m/z = 248$ et 208 . Le signal à $m/z = 216$ provient de la perte des deux méthyles et d'un hydrogène du fragment à $m/z = 248$. Un autre signal important est l'ion à $m/z = 439$ qui est le résultat de $[\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}]$.

b) Impact électronique (EI)

Le spectre de EI ne présente pas l'ion moléculaire de **C3** mais le résultat de la fragmentation de Diels Alder ($m/z = 248$). L'absence d'ion moléculaire est fréquente lorsqu'il s'agit de fonctions alcools tertiaires. Dans le spectre EI, on peut observer également les signaux à $m/z = 203$ y $m/z = 189$. Le premier, $m/z = 203$ prend son origine de l'élimination de trois méthyles [$248 - 3 \text{ CH}_3$]. Le second, $m/z = 189$, vient de 208 (l'autre fragment provenant de la fragmentation rétro Diels Alder) moins un proton et une molécule d'eau, [$208 - \text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}$]. La Figure # 27 présente l'origine des fragments provenant des ionisations de la molécule **C3** selon Budzikiewicz et al., 1985.

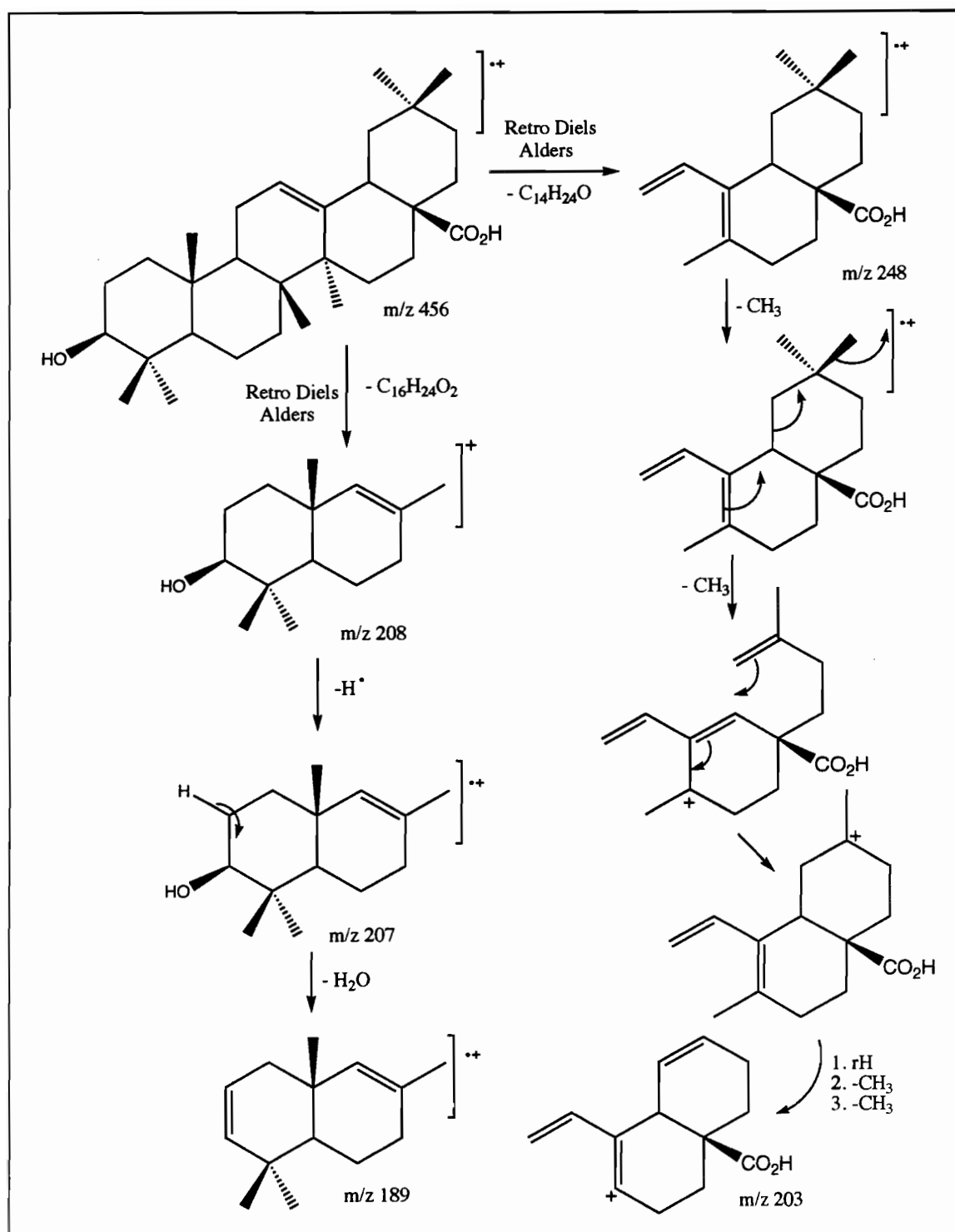


FIGURE # 27. Fragments observés en ionisation de C3.

3. Données d'Infra Rouge (IR)

Dans le spectre IR de **C3**, on observe une bande large et intense centrée à 3450 cm^{-1} propre des vibrations de tension des OH des acides et alcools. Les signaux à 2940 cm^{-1} (vibrations de tension C-H des méthyles et alcanes), 2857 cm^{-1} (vibrations de tension C-H des alcanes), 1694 cm^{-1} (vibrations de tension CO), 1463 cm^{-1} (vibrations de déformation antisymétrique de CH_3 y CH_2 des groupes alkyle), 1385 cm^{-1} (vibrations de torsion d'alcools secondaires cycliques), 604 cm^{-1} (vibrations de déformations du type ciseau, bending, en O-C=O).

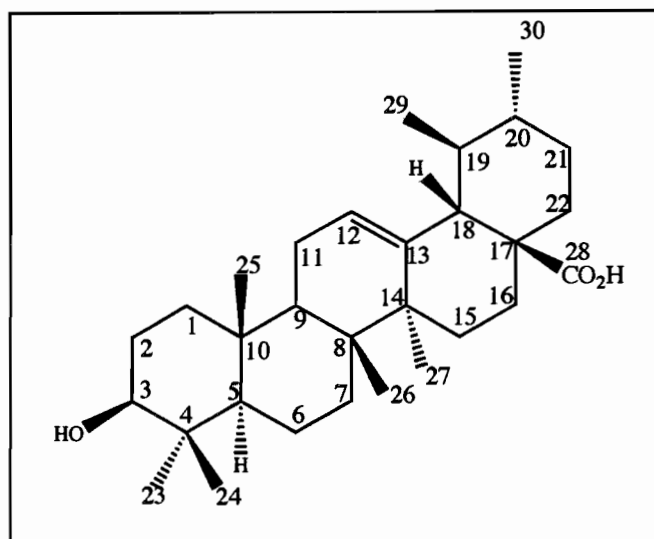
4. Données de Rotation Spécifique ($[\alpha]_D^{25}$)

Nous avons préparé une solution de **C3** à c 0.1 en CHCl_3 , et nous avons mesuré sa rotation dans une cuvette de 0.1 cm de large à 25°C et à 589 nm. Le polarimètre a donné une rotation observée de + 0.075°. Moyennant l'équation: $[\alpha]_D^{25} = \alpha / cl$ nous avons obtenu une rotation spécifique égale à + 75°. La littérature présente un $[\alpha]_D^{12} = + 79.5$ en CHCl_3 .

Conclusion: Le composé **C3** est l'acide oléanolique sur la base de l'utilisation raisonnée des données spectrales, de la comparaison de données bibliographiques de RMN et à la comparaison des propriétés physiques avec un échantillon de référence à savoir le facteur de rétention en CCM ($R_f = 0.19$, 10% AcOEt- CHCl_3) et le point de fusion ($pf = 306^\circ$).

D.Composé C4: Acide ursolique

Le composé **C4** se présente sous la forme d'un solide blanc. L'analyse des expériences de RMN et SM a permis l'établissement de sa structure qui correspond à l'acide ursolique:



1. Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

a) Résonance Magnétique du proton (^1H -RMN)

Le fait d'observer cinq fins singulets et deux doublets entre 1.16 à 0.70 ppm, dans le spectre de ^1H -RMN indique la présence de cinq méthyles angulaires et 2 méthyles en jonction à $-\text{CH}-$ dans la structure du triterpène. En se déplaçant vers les champs faibles, on observe un doublet pour un proton à 2.17 ppm (1H, d, 11 Hz, H-18). Un doublet de doublet pour un proton porté par un carbone oxygéné est visible à 3.17 ppm (1H, dd, 8, 8 Hz, H-3). Le dernier signal à 5.22 (1H, dd, 4.0, 4.0 Hz, H-12) constitue le méthine d'un système éthylénique.

b) Résonance Magnétique du carbone, J-MODulated spin-echo experiment (^{13}C -JMOD-RMN)

Le spectre de ^{13}C -JMOD-RMN montre dans la zone des $-\text{CH}-$ et $-\text{CH}_3$, 14 signaux desquels 7 correspondent aux méthyles. Dans la partie positive du spectre, où apparaissent les $-\text{CH}_2-$ et les carbones quaternaires, on distingue 16 signaux. En additionnant les signaux positifs et négatifs de notre spectre J-modulé, nous obtenons 30 carbones. Avec l'information des 7 signaux intenses dans la région des méthyles, obtenue dans le spectre de proton, et avec le nombre de 30 carbones, enregistrés dans le spectre de carbone, nous concluons que notre molécule est un triterpène avec 5 méthyles angulaires. D'autres données importantes sont le signal à 78.7 ppm (C-3) correspondant à un $-\text{CH}-$ oxygéné, le signal à 125.5 ppm (C-12) correspondant à un CH insaturé, le signal à 138.2 ppm (C-13) typique d'un carbone quaternaire insaturé et celui à 180.6 ppm (C-28) qui est dû à un carbonyle de type acide.

c) Corrélation hétéronucléaire directe: Heteronuclear Simple

Quantum Correlation (HSQC)

Le Tableau # 23 présente les données de ^{13}C - JMOD-RMN et ses corrélations avec le spectre de ^1H -RMN moyennant le HSQC.

Atome	Carbone [ppm]	Proton [ppm]	Groupe fonctionnel
25	15.2	0.91 (s)	CH_3^-
24	15.5	0.75 (s)	CH_3^-
26	16.8	0.80 (s)	CH_3^-
29	16.9	0.84 (d, 6.5 Hz))	CH_3^-
6	18.3	1.34 ¹ (ddd, 11.5, 11.5, 11.5 Hz) 1.49 ² (m)	$-\text{CH}_2^-$
30	22.0	0.93 (d, 6.0 Hz)	CH_3^-
11	23.3	1.88 (dd, 6.8, 3.0 Hz)	$-\text{CH}_2^-$
27	23.4	1.07 (s)	CH_3^-
16	24.2	1.98 ¹ (ddd, 13.9, 13.9, 3.8 Hz) 1.63 ² (dd, 13.0, 3.0 Hz)	$-\text{CH}_2^-$
2	26.7	1.63 ² (dd, 13.0, 3.0 Hz) 1.49 ¹ (ddd, 12.5, 12.5, 12.5 Hz) ³	$-\text{CH}_2^-$
23	27.9	0.95 (s)	CH_3^-
15	28.0	1.85 ¹ (ddd, 14.0, 14.0, 4.0 Hz) 1.06 ² (m)	$-\text{CH}_2^-$
22	30.6	1.31 ¹ (dd, 12.8, 12.8 Hz) 1.47 ² (m)	$-\text{CH}_2^-$
7	33.0	1.47 ¹ (ddd, 7.5, 7.5, 5.0 Hz) 1.32 ² (dd, 7.5, 5.0 Hz)	$-\text{CH}_2^-$
10	36.0	-	Cq

¹: Proton en position axiale (x). Dans quelques cas, on observe nettement un triplet comme tache de corrélation en HSQC pour les couplages $J_{\text{gem},xx}$.

²: Proton en position équatoriale (q). Dans quelques cas, on observe nettement un doublet comme tache de corrélation en HSQC pour les couplages J_{gem} .

³: Signal obtenu grâce au spectre de COSY.

Cq: carbone quaternaire

TABLEAU # 23. Assignations des carbones et des protons à partir des données du spectre HSQC de C4 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$).

Atome	Carbone [ppm]	Proton [ppm]	Groupe fonctionnel
21	36.9	1.61 ¹ (ddd, 12.8, 12.8 Hz) 1.69 ² (ddd, 13.0, 5.0, 5.0 Hz)	-CH ₂ -
1	38.6	1.61 ¹ (ddd, 12.8, 12.8, 3.0 Hz) 1.63 ² (dd, 13.0, 3.0 Hz)	-CH ₂ -
4	38.7	-	Cq
20	38.9	0.98 (m)	-CH-
19	39.1	1.31 (m)	-CH-
8	39.5	-	Cq
14	42.0	-	Cq
9	47.5	1.49 ¹ (dd, 7.5, 7.5 Hz)	-CH-
17	47.8	-	Cq
18	52.8	2.17 ¹ (d, 11.0 Hz)	-CH-
5	55.3	0.71 ¹ (d, 11.5 Hz)	-CH-
3	78.7	3.17 ¹ (dd, 8.0, 8.0 Hz)	-CHOH-
12	125.5	5.22 (dd, 4.0, 4.0 Hz)	-CH=Cq-
13	138.2	-	-Cq=CH-
28	180.6	-	Cq (COOH)

¹: Proton en position axiale (x). Dans quelques cas, on observe nettement un triplet comme tache de corrélation en HSQC pour couplages $J_{gem,xx}$.

²: Proton en position équatoriale (q). Dans quelques cas, on observe nettement un doublet comme tache de corrélation en HSQC pour couplages J_{gem} .

Cq: carbone quaternaire

TABLEAU # 23. Suite. Assignations des carbones et des protons à partir des données du spectre HSQC de C4 (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).

d) Corrélations hétéronucléaire et homonucléaire scalaire:

Heteronuclear Multiple- Bound Correlation (HMBC) et

Correlated SpectroscopY (COSY)

Les corrélations de HMBC et COSY du composé **C4** sont résumées respectivement dans les Tableaux # 24 et # 25. Dans la figure #28, on note par des flèches foncées les corrélations observées sur le spectre HMBC et en claire celles du spectre COSY.

Atome	Carbone [ppm]	Corrélation à 2J [ppm]	Corrélation à 3J [ppm]	Corrélation à 4J [ppm]
28	180.6		2.17 (H-18)	1.69, 1.61 (H-21)
13	138.2	5.22 (H-12) 2.17 (H-18)	1.88 (H-11) 1.31 (H-19) 1.07 (H-27)	
12	125.5	1.88 (H-11)	2.17(H-18)	1.06 ¹ (H-15)
3	78.7	1.63 (H-2)	1.61, 1.63 (H-1) 0.95 (H-23) 0.75 (H-24) 0.71 (H-5)	
5	55.3	1.34, 1.49 (H-6)	1.61, 1.63 (H-1) 1.49 (H-9) 1.32, 1.47 (H-7) 0.91 (H-25) 0.95 (H-23) 0.75 (H-24)	1.49, 1.63 (H-2)
18	52.8	1.31 (H-19)	1.98, 1.63 (H-16) 1.31, 1.47 (H-22) 0.84 (H-29)	1.88 (H-11) 1.69, 1.61 (H-21)
17	47.8	2.17 (H-18) 1.98 (H-16) 1.31, 1.47 (H-22)	1.69, 1.61 (H-21)	0.98 (H-20)
9	47.5	1.88 (H-11)	1.61, 1.63 (H-1) 1.32, 1.47 (H-7) 0.91 (H-25) 0.80 (H-26) 0.71 (H-5)	1.85 (H-15) 1.49 (H-2)
14	42.01	1.06, 1.85 (H-15) 1.07 (H-27)	5.22 (H-12) 2.17 (H-18) 1.98, 1.63 (H-16) 1.47 (H-7) 1.49 (H-9) 0.80 (H-26)	1.88 (H-11)
8	39.4	1.49 (H-9)	1.88 (H-11) 1.85 (H-15) 1.49 (H-6) 1.07 (H-27)	0.71 (H-5)
19	39.1	2.17 (H-18)	1.69, 1.61 (H-21)	1.63 (H-16) 1.47 (H-22)
20	38.9	1.69, 1.61 (H-21) 1.31 (H-19)	2.17 (H-18) 11.31 (H-22)	

¹: Tache faible

TABLEAU # 24. Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre HMBC de C4 (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).

Atome	Carbone [ppm]	Corrélation à 2J [ppm]	Corrélation à 3J [ppm]	Corrélation à 4J [ppm]
4	38.7	3.17 (H-3) 0.71 (H-5) 0.75 (H-24)	1.34, 1.49 (H-6) 1.49, 1.63 (H-2)	1.61, 1.63 (H-1) 1.32 (H-7) 0.91 (H-25) 1.49 (H-9)
1	38.6	1.49, 1.63 (H-2)	3.17 (H-3) 1.49 (H-9) 0.71 (H-5) 0.91 (H-25)	1.34, 1.49 (H-6)
21	36.9	1.31, 1.47 (H-22) 0.98 (H-20)	1.31 (H-19)	1.69, 1.61 (H-21)
10	36.8	1.61, 1.63 (H-1) 0.91 (H-25) 0.71 (H-5)	1.88 (H-11) 1.63 (H-2)	5.22 (H-12) 1.32, 1.47 (H-7)
7	33.0	1.34 (H-6)	0.80 (H-26)	
22	30.6	1.69, 1.61 (H-21)	1.63 (H-16)	1.31 (H-19) 0.93 (H-30)
15	28.0	1.98 (H-16)	1.07 (H-27)	
23	27.9		3.17 (H-3) 0.75 (H-24) 0.71 (H-5)	
2	26.7	3.17 (H-3) 1.61, 1.63 (H-1)		
16	24.2		2.17 (H-18)	1.69, 1.61 (H-21)
27	23.4		1.06, 1.85 (H-15)	5.22 (H-12) 1.49 (H-9) 1.47 (H-7)
11	23.3	5.22 (H-12) 0.71 (H-5)		1.47 (H-7)
30	22.0		1.31 (H-19)	1.31, 1.47 (H-22)
6	18.3	1.32 (H-7)		1.63 (H-1)
29	16.9	1.31 (H-19)	2.17 (H-18)	
26	16.8		1.49 (H-9) 1.32, 1.47 (H-7)	1.49 (H-6)
24	15.5		3.17 (H-3) 0.95 (H-23) 0.71 (H-5)	1.49, 1.63 (H-2)
25	15.2		1.63 (H-1) 1.49 (H-9) 0.71 (H-5)	1.49, 1.63 (H-2)

**TABLEAU # 24. Suite. Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre
HMBC de C4 (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).**

Atome	Proton ¹ [ppm]	Corrélation à ¹ J [ppm]
12	5.22	1.88 (H-11)
18	2.17x	1.31x (H-19)
2	1.63q	3.17x (H-3)
	1.49x	3.17x (H-3)
16	1.63q	1.98x (H-16) 1.06q, 1.85x (H-15)
	1.98x	1.63q (H-16) 1.06q, 1.85x (H-15)
11	1.88	1.49x (H-9)
15	1.06q	1.85x (H-15) 1.98x, 1.63q (H-16)
	1.85x	1.06q (H-15) 1.98x, 1.63q (H-16)
21	1.69q	1.61x (H-21) 1.47q, 1.31x (H-22)
	1.61x	1.69q (H-21) 1.47q, 1.31x (H-22) 0.98 (H-20) ²
1	1.63q	1.61x ³ (H-1) 1.63q ³ , 1.49x ³ (H-2)
	1.61x	1.63q ³ (H-1) 1.63q ³ , 1.49x ³ (H-2)
22	1.31x	1.47q (H-22) 1.69q, 1.61x (H-21)
	1.47q	1.31x (H-22) 1.69q, 1.61x (H-21)
6	1.34x	1.49q (H-6) 1.47x ³ (H-7) 0.71x (H-5)
	1.49q	1.34x (H-6) 0.71x (H-5)

¹: x: axial, q: équatorial
la diagonale

²: Tache très faible

³: Tache de corrélation dans

TABLEAU # 25. Corrélations homonucléaires provenant du spectre COSY de C4.

Atome	Proton ¹ [ppm]	Corrélation à ¹ J [ppm]
5	0.71x	1.49q (H-6) 1.34x (H-6)
19	1.31x	2.17x (H-18) 0.84 (H-29) 0.98 (H-20) ²
7	1.47x	1.32q (H-7) 1.34x ³ (H-6)
	1.32q	1.47x (H-7) 1.34x ³ (H-6)
20	0.98	1.31x (H-19) ² 1.61x (H-21) 0.93 ³ (H-30)

¹: x: axial, q: équatorial
la diagonale

²: Tache très faible

³: Tache de corrélation dans

TABLEAU # 25. Suite. Corrélations homonucléaires provenant du spectre COSY de C4.

En partant du signal du carbone oxygéné (78.7 ppm, C-3), on observe dans le spectre HMBC les corrélations avec les protons à 1.61, 1.63 ppm (H-1), 0.95 ppm (H-23), 0.75 ppm (H-24) et 0.71 ppm (H-5). Le proton de ce carbone oxygéné (3.17 ppm, H-3) présente également dans le spectre COSY un couplage avec les protons à 1.49, 1.63 ppm (H-2). À partir de l'analyse du spectre HMBC, on observe que le carbone du proton le plus blindé (55.3 ppm, C-5) présente des corrélations avec trois groupes méthyliques (0.95 ppm, H-23; 0.75 ppm, H-24; 0.91 ppm, H-25) à un –CH– (1.49 ppm, H-9) et avec deux –CH₂– (1.61, 1.63 ppm, H-1 et 1.32, 1.47 ppm, H-7). Le proton le plus blindé (0.71 ppm, H-5) présente également un couplage sur le spectre COSY avec les protons à 1.34 et à 1.49 ppm (H-6). Dans l'analyse présentée jusqu'à présent, on observe que les cycles A et B proches de l'alcool portent également les méthyles 23, 24 et 25. La Figure # 28 présente cette partie de la molécule appelée fragment A.

En partant du carbone quaternaire insaturé (138.2 ppm, C-13), on observe sur le spectre HMBC les corrélations avec le méthyle à 1.07 ppm (H-27), avec le –CH– en 1.31 ppm (H-19) et avec le –CH₂– en 1.88 ppm (H-11). De la même façon, ces derniers protons (1.88 ppm, H-11) couplent dans le COSY avec le méthine à 5.22 ppm (H-12) et avec le –CH– à 1.49 ppm (H-9). De plus, le proton du –CH– à 1.49 ppm (H-9) présente dans le spectre HMBC un couplage avec le carbone quaternaire à 42.0 ppm (C-14). En suivant l'enchaînement des atomes, on observe que le carbone à 42.0 ppm (C-14) présente des couplages avec les protons préalablement indiqués avec les valeurs de déplacements chimiques à 5.22 ppm (H-12) et 0.80 ppm (H-26) et ceux qui résonnent à 2.17 ppm (H-18) et à 1.98, 1.63 ppm (H-16). Ces derniers protons présentent des corrélations homonucléaires avec les protons à 1.06 et à 1.85 (H-15) et hétéronucléaires avec le carbone à 52.8 ppm (C-18). Cette partie du composé **C4** est présentée dans la Figure # 28 comme le fragment B.

Pour armer le dernier fragment ou fragment C, on part du carbone acide à 180.6 ppm (C-28) qui est en relation sur le spectre HMBC avec le proton à 2.17 ppm (H-18). Ce dernier proton (H-18) nous donne le réseau de connectivités suivantes sur le spectre COSY: il couple avec le proton à 1.31 ppm (H-19). Le proton H-19 couple avec les protons en 0.84 ppm (H-29) et 0.98 ppm (H-20) et le proton H-20 avec le proton à 1.61 ppm (H-21). Le carbone auparavant mentionné à 52.8 ppm (C-18) est en relation sur le spectre HMBC avec les protons à 1.31, 1.47 ppm (H-22) et 0.84 ppm (H-29). Ce dernier fragment ou fragment C est dessiné dans la Figure # 28.

L'union des trois fragments A, B et C est faite grâce aux corrélations en HMBC du carbone à 33.0 ppm (C-7) au méthyle à 0.80 ppm (H-26), du carbone quaternaire insaturé à 138.2 ppm (C-13) au proton à 1.31 ppm (H-19) et du carbone à 30.6 ppm (C-

22) au proton à 1.63 ppm (H-16). La Figure # 28 montre aussi ces dernières corrélations qui permettent arriver à la structure du triterpène.

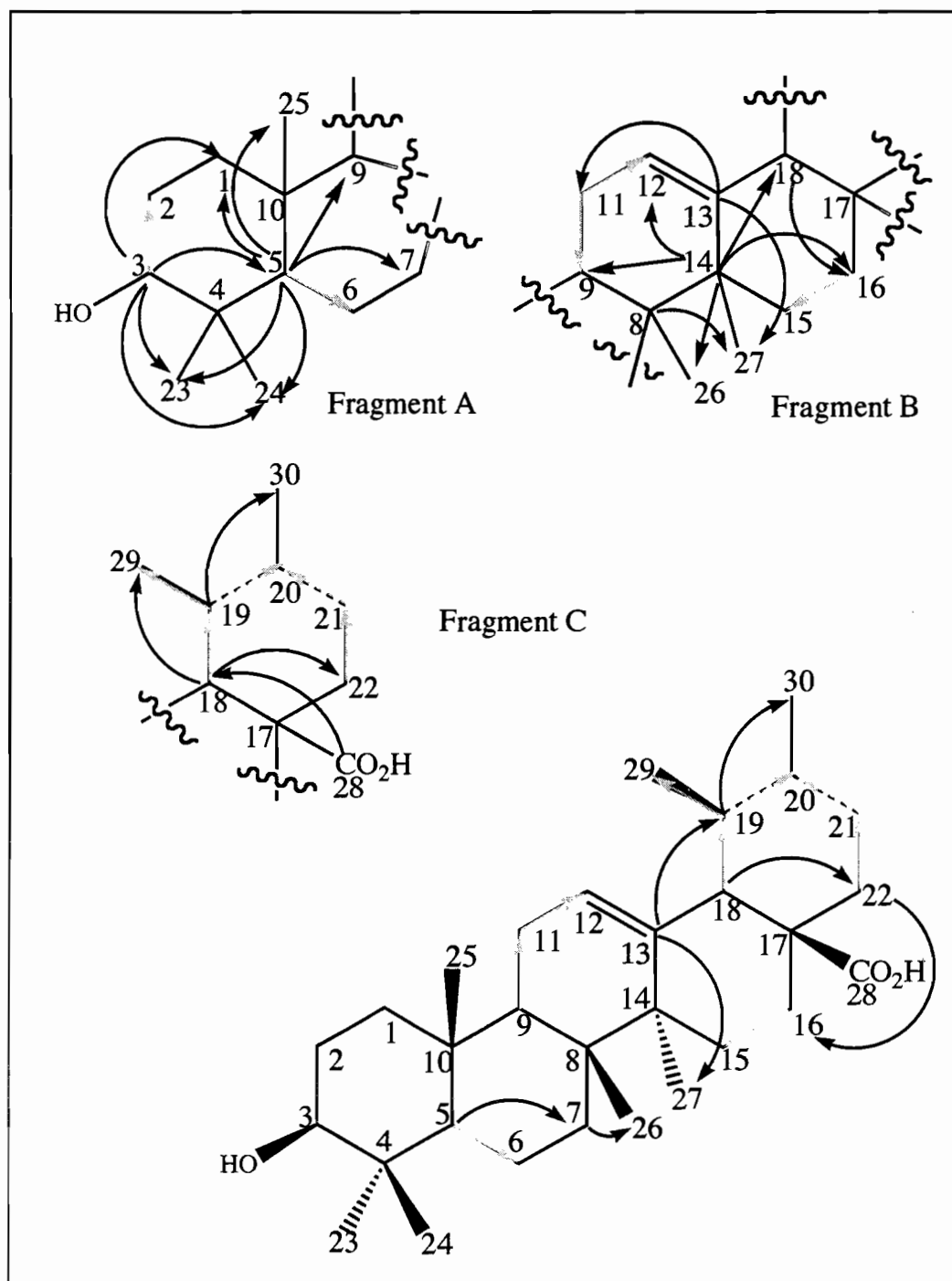


FIGURE # 28. Représentation des corrélations représentatives en HMBC et COSY de C4.

Pour définir les centres chiraux de la molécule **C4**, nous analysons chaque cycle. Si nous partons des cycles A et B dans la molécule triterpénique présentée dans la Figure # 28, on remarque que le proton à 0.71 ppm (H-5) possède une constante de couplage de 11.5 Hz avec le proton axial voisin au déplacement chimique à 1.34 ppm ($J = 11.5$ Hz, H-6). La valeur de la constante de couplage entre (H-5) et (H-6), $J_{x,e}$, correspond à un système axial. Entre les cycles D et E, nous observons le proton à 2.17 ppm (d, 11.0 Hz, H-18). Ce couplage indique que le proton (H-18) ainsi que son voisin le proton à 1.31 ppm, (m, H-19) sont en position diaxiale. Finalement, dans le cycle E, nous avons un proton à définir; le proton (H-20). Le spectre COSY du composé **C4** montre une tache de corrélation très faible entre H19 et H20 et comme ces protons (H19 et H20) sont des multiplets, leur constante de couplage commune est difficile à déterminer.

La représentation tridimensionnelle possible de la molécule **C4** est indiquée dans la Figure # 29. Nous pourrions conclure que la molécule en question est un isomère de l'acide ursolique qui se différencie de ce dernier seulement dans l'orientation du proton (H-20). Dans l'acide ursolique, ce proton possède une orientation axiale alors que dans la molécule **C4**, on le place en position équatoriale. Cette position pourrait être justifié par les valeurs de couplage que l'on observe en COSY. Il est important de souligner que dans le spectre COSY la tache de corrélation entre les protons (H-20) et (H-19) n'est presque pas distinguable ce qui obligerait à définir un couplage axial-équatorial. Si le couplage des protons mentionnés était axial-axial la tache de corrélation devrait être plus intense ou remarquable. Avec l'information spectroscopique présentée, nous pourrions proposer pour **C4** la structure de l'acide dihydrotomentosolique. Cette molécule serait un composant provenant de l'hydrogénation de l'acide tomentosolique [Barton et al., 1962], mais il n'a pas une référence concrète pour comparer les spectres.

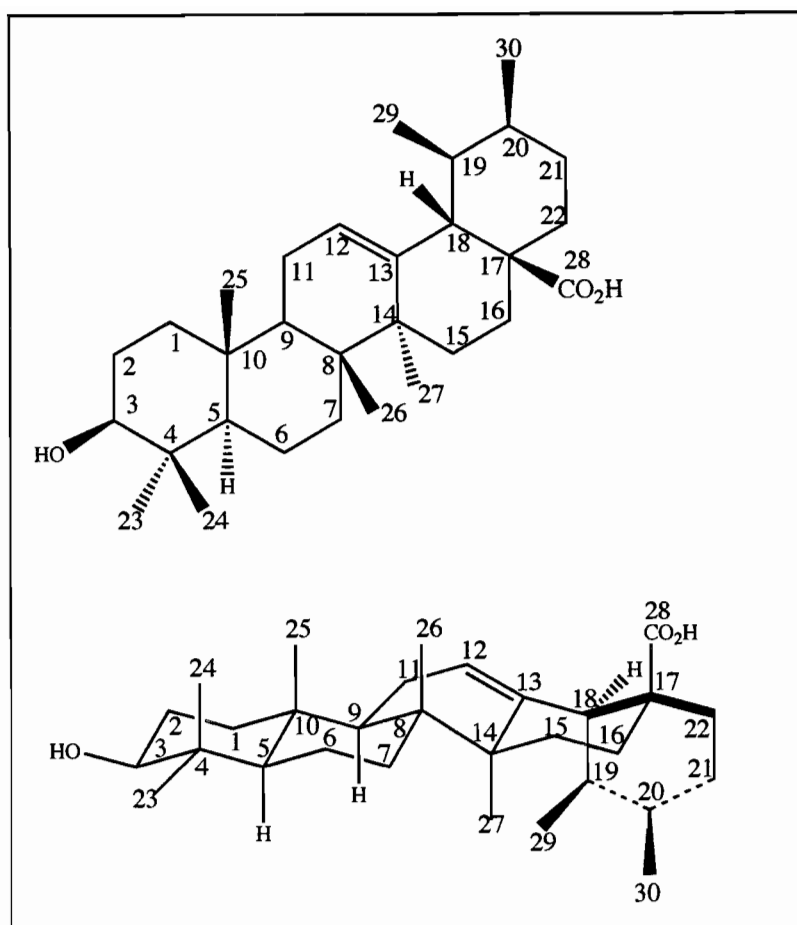


FIGURE # 29. Possible représentation tridimensionnelle de C4.

Pour confirmer l'identité de notre molécule **C4**, nous avons réalisé des études spectroscopiques (COSY) avec l'acide ursolique commercial dans les mêmes conditions (500 MHz, CDCl_3 -MeOD) et comparé ses spectres avec ceux du composé **C4**. Les spectres obtenus sont rigoureusement identiques à ceux de notre composé, nous concluons que le composé **C4** est l'acide ursolique. Cependant le spectre COSY du composé **C4** montre une tache de corrélation très faible entre H-19 et H-20, ce qui est étrange pour 2 protons diaxiaux (configuration de l'acide ursolique). Le Tableau # 26 présente la comparaison des données de ^{13}C -RMN de **C4** et celles qui sont reportés dans la littérature [Seebacker et al., 2003]. La Figure # 30 montre la représentation des différentes structures tridimensionnelles de **C4**.

Atome	¹³ C-RMN [ppm] C4	¹³ C-RM [ppm] Acide ursolique
1	40.0	39.0
2	29.1	28.2
3	79.0	78.2
4	40.3	39.6
5	56.7	55.9
6	19.7	18.8
7	34.5	33.7
8	40.9	40.1
9	49.0	48.1
10	38.4	37.5
11	24.6	23.7
12	126.6	125.7
13	140.2	139.3
14	43.4	42.6
15	29.6	28.8
16	25.8	25.0
17	48.0	48.1
18	54.48	53.6
19	40.41	39.5
20	40.3	39.4
21	32.0	31.1
22	38.2	37.4
23	29.7	28.8
24	17.5	16.6
25	16.6	15.7
26	18.4	17.5
27	24.8	24.0
28	180.9	179.7
29	18.4	17.5
30	22.3	21.4

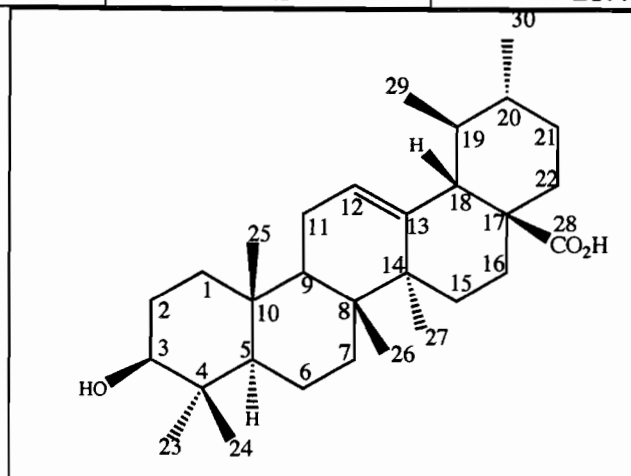


TABLEAU # 26. Comparaison des données expérimentales ¹³C-RMN de C4 et de l'acide ursolique de la littérature (500 MHz, Pyridine).

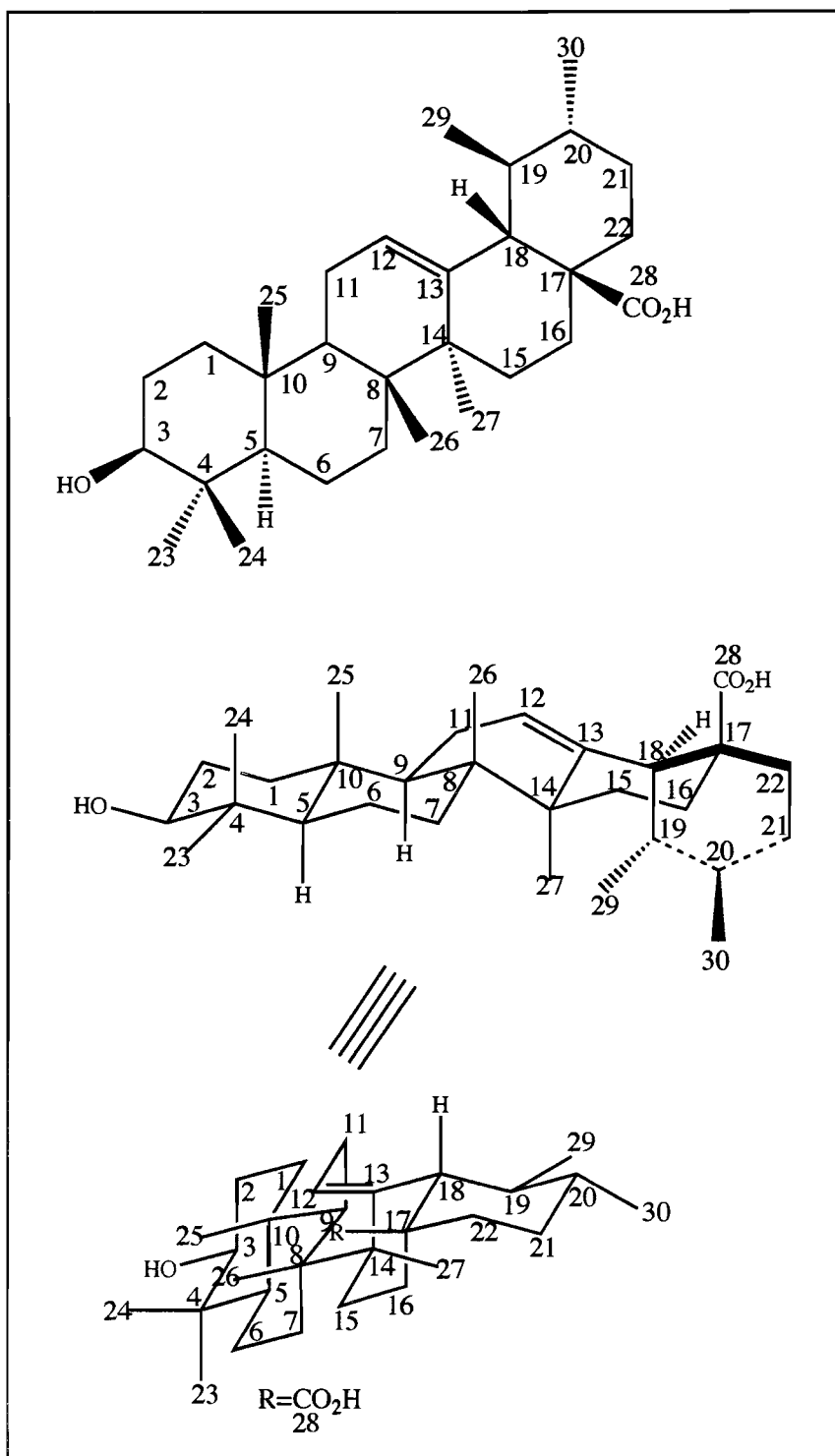


FIGURE # 30. Représentation des différentes structures tri-dimensionnelles de C4.

2. Données de Spectrométrie de Masses (EM)

a) Ionisation chimique directe (DCI)

Le spectre de **C4** présente un ion à $m/z = 474$ correspondant à l'ion moléculaire plus le gaz de ionisation (NH_3). L'ion moléculaire apparaît à $m/z = 457$ ($M + \text{H}^+$) et à partir du quel moyennant une fragmentation de type rétro Diels Alder, on obtient l'ion à $m/z = 248$. Un autre signal important est l'ion à $m/z = 439$ qui est le résultat de $[M + \text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}]$.

b) Impact électronique (EI)

Le spectre d'EI présente l'ion moléculaire de **C4** à $m/z = 456$ et les fragments provenant de sa fragmentation moyennant la rupture rétro Diels Alder: $m/z = 248$ et $m/z = 207$. Dans le spectre EI, on remarque également les signaux à $m/z = 203$ et $m/z = 189$. Le premier, $m/z = 203$, prend son origine de $[248 - 3 \text{CH}_3]$. Le second, $m/z = 189$, vient de 207 moins une molécule d'eau, $[207 - \text{H}_2\text{O}]$. L'origine de ces fragments est égale à celle indiquée préalablement pour **C3**, Figure # 27.

3. Données d'Infra Rouge (IR)

Le spectre IR de **C4** présente une large bande centrée à 3420 cm^{-1} propre des vibrations de tension des OH des acides et alcools. Les signaux à 2966 cm^{-1} (vibrations de tension C-H des méthyles et alcanes), 2871 cm^{-1} (vibrations de tension C-H des alcanes), 1693 cm^{-1} (vibrations de tension des CO), 1456 cm^{-1} (vibrations de déformation antisymétrique des CH_3 y CH_2 des groupes alkyles), 1387 cm^{-1} (vibrations de torsion symétrique de CH_3 des groupes alkyles), 1029 cm^{-1} (vibrations de tension

d'alcools secondaires cycliques) et 661 cm^{-1} (vibrations de déformation du type de ciseau, bending, en O-C=O).

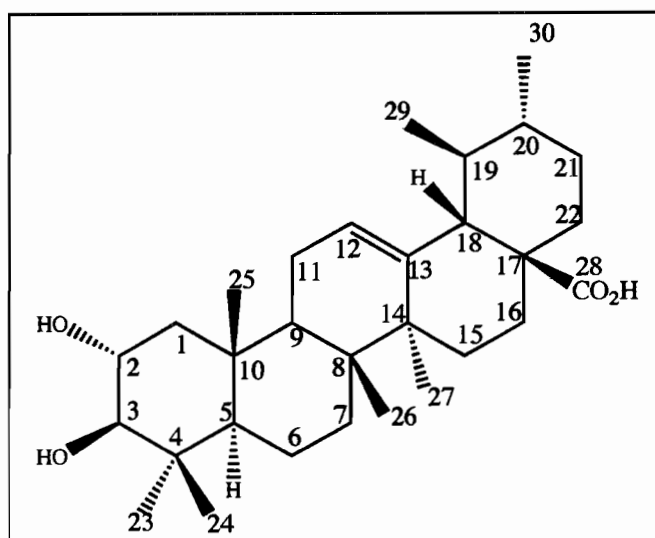
4. Données de Rotation Spécifique ($[\alpha]_D^{25}$)

Nous avons préparé une solution de **C4** à c 0.1 en CHCl_3 et nous avons utilisé une cuvette de 0.1 cm de large, à 25°C et à 589 nm. Le polarimètre a mesuré une rotation observée de $+0.073^\circ$. Moyennant l'équation: $[\alpha]_D^{25} = \alpha / cl$ nous avons obtenu une rotation spécifique égale à $+73^\circ$. De la même façon, nous avons préparé une solution de l'acide ursolique commercial en obtenant pour cet essai une rotation observée de $+0.079^\circ$ et une rotation égale à $+79^\circ$.

Conclusion: Le composé **C4** est l'acide ursolique. Cette caractérisation a utilisé les données directes de la RMN. Elle a été confirmée par la comparaison des spectres de l'acide commercial, celles des données bibliographiques et à la comparaison de propriétés physiques, à savoir le facteur de rétention en CCM ($R_f = 0.62$, AcOEt) et le point de fusion ($pf = 290^\circ$).

E. Composé C5: Acide corosolique

Le composé **C5** se présente sous la forme d'un solide blanc. L'analyse des expériences de RMN et SM a permis l'établissement de sa structure qui correspond à l'acide corosolique:



1. Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres protons, carbones et 2D obtenus pour ce composé présentent des impuretés, essentiellement des phtalates et un second composant en quantité infime (ce composé impur est dénommé **C5a**). On a purifié le produit majoritaire qui a été obtenu en faible quantité pour les tests biologiques et l'analyse du composé sans contaminant n'a porté que sur une partie des données spectrales. La détermination structurale va se faire essentiellement à l'aide des spectres RMN du composé contaminé ou **C5a**.

a) Résonance Magnétique du proton (¹H-RMN)

Comme on l'a vu pour le composant précédant **C4**, le spectre de ¹H-RMN de **C5** présente cinq singulets fins et deux doublets entre 0.70 et 1.16 ppm. L'apparence de ces signaux indique la présence de cinq méthyles angulaires et 2 méthyles de jonction à CH

dans le cycle du triterpène. En se déplaçant vers les bas champs, on obtient deux doublets, chaque doublet est attribuable à un proton à 2.15 ppm (1H, d, 10.5 Hz, H-18) et à 2.89 ppm (1H, d, 9.5 Hz, H-3) ce dernier correspondant à un CH oxygéné. Ensuite, on observe un multiplet pour un proton porté par un carbone oxygéné à 3.61 ppm (1H, ddd, 10.6, 10.6, 3.8 Hz, H-2). Le dernier signal à 5.22 ppm (1H, t, 3.2 Hz, H-12) constitue le méthine d'un système éthylénique.

b) Résonance Magnétique du carbone, J-MODulated spin-echo experiment (^{13}C -JMOD-RMN)

Le spectre de carbone a été enregistré avec **C5a**. Les signaux correspondant aux contaminants ont été éliminés à l'aide du spectre HSQC par soustraction de ces signaux qui n'existe pas en ^1H -RMN du composé purifié (**C5**). Les spectres de ^{13}C -JMOD-RMN de **C5a** montrent dans la zone des -CH- y -CH₃, 18 signaux, dont trois sont des contaminants. Dans la partie positive du spectre, on différencie 16 signaux, parmi lesquels, l'un d'entre eux est éliminé comme contaminant. En ajoutant les signaux positifs et négatifs de notre spectre J-modulé, nous obtenons 30 carbones. À champs forts, on apprécie les 7 signaux méthyléniques préalablement observés en ^1H -RMN. À partir de ces données, nous concluons que notre molécule est un triterpène avec 5 méthyles angulaires. D'autres données importantes sont les signaux à 68.5 et 83.4 ppm correspondant à des CHs oxygénés (C-2, C-3), le signal à 125.2 ppm correspondant à un CH non saturé (C-12), le signal à 138.7 ppm est typique d'un carbone quaternaire insaturé (C-13) et celui à 180.5 ppm est dû à un carbonyle de type acide (C-28).

c) Corrélation hétéronucléaire directe: Heteronuclear Simple

Quantum Correlation (HSQC)

Le Tableau # 27 présente les données de ^{13}C - JMOD-RMN et ses corrélations avec le spectre de ^1H -RMN moyennant le HSQC.

Atome	Carbone [ppm]	Proton [ppm]	Groupe fonctionnel
25	16.5	0.98 (s)	CH_3 -
26	16.6	0.79 (s)	CH_3 -
24	16.8	0.79 (s)	CH_3 -
29	16.8	0.85 (d)	CH_3 -
6	18.3	1.50^1 (dddd, 10.0, 10, 10, 5 Hz) 135^2 (m)	$-\text{CH}_2-$
30	21.0	0.93 (d, 6.5 Hz)	CH_3 -
11	23.3	1.93 (dd, 8.5, 4.0 Hz)	$-\text{CH}_2-$
27	23.4	1.08 (s)	CH_3 -
16	24.2	1.98^1 (ddd, 12.5, 12.5, 5.0 Hz) 1.63^2 (dd, 12.5, 5.0 Hz)	$-\text{CH}_2-$
15	28.0	1.86^1 (ddd, 12.5, 12.5, 5.0 Hz) 1.06^2 (m)	$-\text{CH}_2-$
23	28.5	0.98 (s)	CH_3 -
21	30.6	1.52^2 (d, 13.8 Hz) 1.38^1 (dd, 12.5, 12.5 Hz)	$-\text{CH}_2-$
7	32.9	1.54^1 (dd, 9.0, 8.5 Hz) 1.35^2 (m)	$-\text{CH}_2-$
22	36.8	1.68^1 (dd, 14.0, 14.0 Hz) 1.63^2 (dd, 14.0, 4.5 Hz)	$-\text{CH}_2-$

¹: Proton en position axiale (x). Dans quelques cas, on observe nettement un triplet comme tache de corrélation sur le spectre HSQC pour les couplages $J_{\text{gem},xx}$.

²: Proton en position équatoriale (q). Dans quelques cas, on observe nettement un doublet comme tache de corrélation sur le spectre HSQC pour les couplages J_{gem} .

TABLEAU # 27. Assignations des carbones et des protons de C5a moyennant le spectre HSQC (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$).

Atome	Carbone [ppm]	Proton [ppm]	Groupe fonctionnel
10	38.0	-	Cq ³
20	38.9	0.98 ² (m)	-CH-
19	39.1	1.34 ¹ (m)	-CH-
4	39.2	-	Cq ³
8	39.5	-	Cq ³
14	42.1	-	Cq ³
1	46.5	1.97 ² (d, 12.5 Hz) 0.90 ¹ (dd, 12.5, 10.5 Hz)	-CH ₂ -
9	47.5	1.56 ¹ (d, 8.5 Hz)	-CH-
17	47.8	-	Cq ³
18	52.8	2.18 ¹ (d, 10.5 Hz)	-CH-
5	55.3	0.78 ¹ (d, 10.0 Hz)	-CH-
2	68.5	3.63 ¹ (m)	-CHOH-
3	83.4	2.91 ¹ (d, 9.5 Hz)	-CHOH-
12	125.2	5.20 (t, 3.6 Hz)	-CH=Cq-
13	138.7	-	-Cq=CH-
28	180.5	-	Cq ³ (COOH)

¹: Proton en position axiale (x). Dans quelques cas, on observe nettement un triplet comme tache de corrélation sur le spectre HSQC pour les couplages J_{gem,xx}.

²: Proton en position équatoriale (q). Dans quelques cas, on observe nettement un doublet comme tache de corrélation sur le spectre HSQC pour les couplages J_{gem}.

³: Cq: carbone quaternaire

TABLEAU # 27. Suite. Assignations des carbones et des protons de C5a moyennant le spectre HSQC (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).

d). Corrélations hétéronucléaires et homonucléaires scalaire:

Heteronuclear Multiple- Bound Correlation (HMBC) et

Correlated Spectroscopy (COSY)

Les corrélations de HMBC et COSY du composé **C5** sont résumées respectivement dans les Tableaux # 28 et # 29. Dans la figure # 31, on note par des flèches foncées les corrélations observées sur le spectre HMBC et en claire celles du spectre COSY.

Atome	Carbone [ppm]	Corrélation a ² J [ppm]	Corrélation a ³ J [ppm]	Corrélation a ⁴ J [ppm]
28	180.5		1.63 (H-22)	
13	138.7	2.18 (H-18)	1.93 (H-11) 1.34 (H-19) 1.08 (H-27)	
12	125.2	1.93 (H-11)	2.18 (H-18)	
3	83.4	3.63 (H-2)	0.98 (H-23) 0.90 (H-1) 0.79 (H-24)	
2	68.5	2.91 (H-3) 0.90 (H-1)		
5	55.3		0.98 (H-23) 0.98 (H-25) 0.79 (H-24) 1.56 ¹ (H-9) 1.97 ¹ (H-1)	
18	52.8		5.20 (H-12) 0.85 (H-29)	
17	47.8	1.98, 1.63 (H-16) 1.68, 1.63 (H-22) 2.18 (H-18)		5.20 (H-12)
9	47.5	1.93 (H-11)	0.98 (H-25) 1.35 ¹ (H-7) 1.97 (H-1) 5.20 (H-12)	
1	46.5		0.98 (H-25) 1.56 (H-9) 2.91 (H-3)	
14	42.1	1.08 (H-27)	5.20 (H-12) 2.18 (H-18) 1.56 (H-9)	1.93 (H-11)
8	39.5	1.56 (H-9)	1.93 (H-11) 1.08 (H-27)	
4	39.2	0.98 (H-23) 0.79 (H-24) 2.91 (H-3)		
19	39.1	0.85 (H-29) 2.18 (H-18)	0.93 (H-30)	
20	38.9	0.93 (H-30)	0.85 (H-29)	

¹: Tache faible

TABLEAU # 28 Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre
HMBC de C5a (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).

Atome	Carbone [ppm]	Corrélation a 2J [ppm]	Corrélation a 3J [ppm]	Corrélation a 4J [ppm]
10	38.0	0.98 (H-25) 1.56 (H-9) 1.97 (H-1)		
7	32.9			1.06 ¹ (H-15)
21	30.6	0.98 (H-20)		
23	28.5		0.79 (H-24) 2.91 (H-3)	
15	27.9		1.08 (H-27)	
16	24.1		2.18 (H-18)	
27	23.4			1.56 (H-9)
11	23.3	1.56 (H-9) 5.20 (H-12)		
30	20.9		1.52 ¹ , 1.38 ¹ (H-21)	
6				
29	16.83	1.34 (H-19)		
24	16.8		2.91 (H-3) 0.98 (H-23)	
26	16.6			1.06 (H-15)
25	16.5		1.97 (H-1) 1.56 (H-9)	

¹: Tache faible

TABLEAU # 28 Suite. Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre HMBC de C5a (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).

Atome	Proton ¹ [ppm]	Corrélation à ¹ J [ppm]
12	5.22	1.90 (H-11)
11	1.90	1.52 (H-9)
1	1.96q	0.88x (H-1) 3.61x (H-2) 2.89x (H-3)
	0.88x	1.96q (H-1) 3.61x (H-2)
2	3.61x	1.96q (H-1) 0.88x (H-1) 2.89x (H-3)
3	2.89x	3.61x (H-2)
15	1.83x	1.04q (H-15) 1.61q, 1.96x (H-16)
	1.04q	1.83x (H-15) 1.61q, 1.96x (H-16)
16	1.61q	1.96x (H-16) 2.15x ² (H-18)
	1.96x	1.61q (H-16)
21	1.49q	1.35x (H-21) 1.61q, 1.67x (H-22) 1.32x ² (H-19)
	1.35x	1.49q (H-21) 1.61q, 1.67x (H-22) 0.94q ³ (H-20)
22	1.67x	1.61q (H-22) 1.49q, 1.35x (H-21)
	1.61q	1.67x (H-22) 1.49q, 1.35x (H-21)
20	0.94	1.32x (H-19) 1.35x ³ (H-21) 0.93 ⁴ (H-30)
30	0.93	0.94 ⁴ (H-20)
19	1.32x	2.15x (H-18) 0.82 (H-29) 0.94q ³ (H-20)
7	1.51x	1.32q (H-7) 1.33q, 1.48x (H-6)
	1.32q	1.51x (H-7) 1.33q, 1.48x (H-6)
6	1.48x	1.33q (H-6) 1.32q, 1.51x (H-7) 0.76x (H-5)
	1.33q	1.48x (H-6) 1.32q, 1.51x (H-7) 0.76x (H-5)
5	0.76x	1.33q, 1.48x (H-6)

¹: x: axial, q: équatorial

²: Couplage signe

³: Tache faible.

⁴: Tache de corrélation dans la diagonale.

TABLEAU # 29. Corrélations homonucléaires provenant du spectre COSY

de C5.

Les protons méthyliques à 0.98 ppm (H-23) et à 0.79 ppm (C-24) corrélient dans le spectre HMBC avec les carbones à 68.5 ppm (C-2), 83.4 ppm (C-3) et 39.2 ppm (C-4). Les protons à 0.98 ppm (H-25) corrélient avec C-1 (46.5 ppm), C-10 (38.0 ppm) et C-9 (47.5 ppm). Les protons à 0.79 ppm (H-26) corrélient avec C-8 (39.5 ppm), C-9 (47.5 ppm) et C-14 (42.1 ppm). Le méthyle à 1.08 ppm (H-27) aussi montre une tache de corrélation avec le carbone à 28.0 ppm (C-15). Le signe méthylique qui est un doublet à 0.85 ppm (H-29) corréle avec les carbones à 39.1 ppm (C-19) et à 52.8 ppm (C-18). Cependant le signe à 0.93 ppm (H-30) est en corrélation avec les carbones à 39.1 ppm (C-19), à 38.9 ppm (C-20) et à 30.6 ppm (C-21). La Figure # 31a, présente le résumé de ces corrélations.

Cinq carbones $-CH_2-$ (C-6 à 18.3 ppm, C-7 à 32.9 ppm, C-11 à 23.3 ppm, C-16 à 24.2 ppm et C-22 à 36.8 ppm), deux carbones $-CH-$ (C-2 à 68.5 ppm et C-12 à 125.2 ppm) et deux carbones quaternaires (C-13 à 138.7 ppm et C-17 à 47.8 ppm) montrent aucune corrélation avec des protons méthyliques. Toutefois, tous ces carbones montrent des taches de corrélation dans le spectre COSY avec les protons $-CH-$ et $-CH_2-$ voisins. La position du proton à 3.63 ppm (H-2) a été confirmée par ses corrélations dans l'HMBC aux carbones à 46.5 ppm (C-1) et à 83.4 ppm (C-3) et par ses couplages en COSY aux protons à 1.97, 0.90 ppm (H-1) et à 2.91 ppm (H-3). Le proton oléfinique à 5.20 ppm (H-12) corréle avec les carbones à 52.8 ppm (C-18) et à 23.3 ppm (C-11). De même, ce dernier carbone présente une interaction à travers deux liaisons avec le proton à 1.56 ppm (H-9). Dans le spectre COSY, on confirme la connectivité du proton à 1.93 ppm (H-11) avec les protons à 1.56 ppm (H-9) et à 5.20 ppm (H-12).

Les carbones quaternaires C-13 et C-17 ont été assignés grâce aux corrélations suivantes en HMBC: le carbone C-13 (138.7 ppm) corréle avec les protons H-18 (2.15 ppm), H-19 (1.34 ppm) et H-11 (1.93 ppm) alors que le carbone C-17 (47.8 ppm)

corrèle avec les protons H-22 (1.68, 1.63 ppm), H-18 (2.18 ppm) et H-16 (1.63, 1.98 ppm). Parmi les carbones $-\text{CH}_2-$ non encore définis, le C-7 (32.9 ppm) corrèle dans le spectre HMBC avec le proton H-9 (1.56 ppm) et les protons qu'il porte (1.54; 1.35 ppm, H-7) couplent dans le spectre COSY avec H-6 (1.50; 1.35 ppm). Enfin, le proton H-6 montre une corrélation homonucléaire avec le proton H-5 (0.78 ppm). Le carbone C-16 (24.2 ppm) présente une tache de corrélation dans le spectre HMBC avec le proton H-18 (2.18 ppm) et en COSY avec H-15 (1.86; 1.06 ppm).

En conclusion de l'analyse, on observe que les protons H-22 (1.68; 1.63 ppm) corrélient avec le carbone C-28 (180.5 ppm) et couplent avec les protons H-21 (1.52; 1.38 ppm). Enfin, le proton H-21 (1.38 ppm) couple avec le proton H-20 (0.98 ppm) et ce dernier couple avec le proton H-19 (1.34 ppm). De même, le proton H-19 couple avec le proton H-18 (2.18 ppm). La Figure # 31b présente le résumé de ces corrélations. Il est important mentionner que les corrélations COSY entre les protons (H-19) et (H-20) et entre (H-20) et (H-21) sont faibles. Des corrélations similaires ont été observées entre ces mêmes protons dans le composé **C4** précédemment analysé.

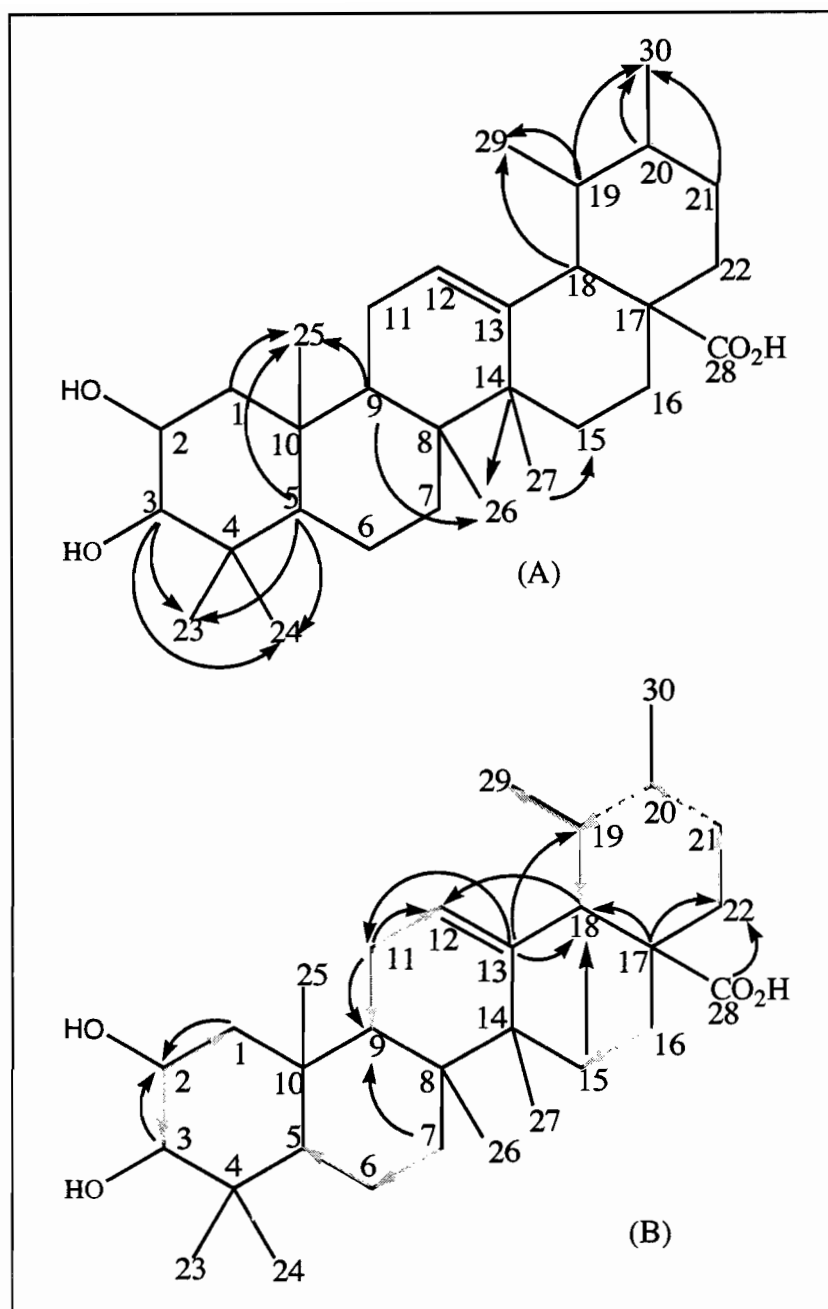


FIGURE # 31. Représentation des corrélations de C5 : (A) corrélations en HMBC à partir des méthyles. (B) corrélations représentatives en HMBC et COSY.

Pour définir les centres chiraux sur la molécule **C5**, nous analysons chaque cycle. Si nous partons des cycles A et B de la molécule triterpénique présentée dans la Figure # 31, on observe que le proton (H-5) à 0.78 ppm possède une constante de couplage de 10.0 Hz avec le proton axial voisin (H-6), 1.50 ppm ($J = 10.0$ Hz). La valeur de la constante de couplage entre (H-5) et (H-6) est propre d'un système diaxial, J_{ax} . En conséquence, l'orientation de (H-5) est α - axial. Une analyse similaire entre les cycles B et C prédit que le proton (H-9), 1.56 ppm (d, 8.5 Hz) est en position également α - axiale. Entre les cycles D et E, nous plaçons le proton (H-18), 2.18 ppm (d, 10.5 Hz). Ce couplage oblige autant le proton (H-18) que son voisin le proton (H-19) (1.34 ppm, d, 10 Hz) à prendre une position diaxiale. Finalement, sur le cycle E nous avons un proton à définir; le proton (H-20). Les corrélations COSY entre les protons (H-19) et (H-20) et entre (H-20) et (H-21) sont faibles et en ayant observé un comportement similaire du couplage entre les protons H-20 y H-19 dans le composant **C4** précédemment analysé, nous proposons de mettre le proton (H-20) en position axiale.

La représentation tridimensionnelle de la molécule **C5** est montrée dans la Figure # 32. Dans cette figure, on constate clairement que la molécule en question pourrait être l'acide ursolique avec une oxydation d'un second carbone. Une révision bibliographique nous conduit à l'acide corosolique. [Bhandari et al., 1990, Lee et al., 1998]. Le Tableau # 30 présente la comparaison des données de ^{13}C -RMN de **C5** et celles reportées dans la littérature pour le corosmate de méthyle [Bhandari et al., 1990]. Il n'y a pas de données de RMN de l'acide corosolique pour faire une comparaison directe des déplacements chimiques. La démonstration utilisant les données structurales du composé isolé permet à elle seule de conclure que **C5** est l'acide corosolique. Nous

avons donc ainsi contribué à l'étude structurale de ce triterpène acide par l'analyse de données originales provenant des spectres bidimensionnels.

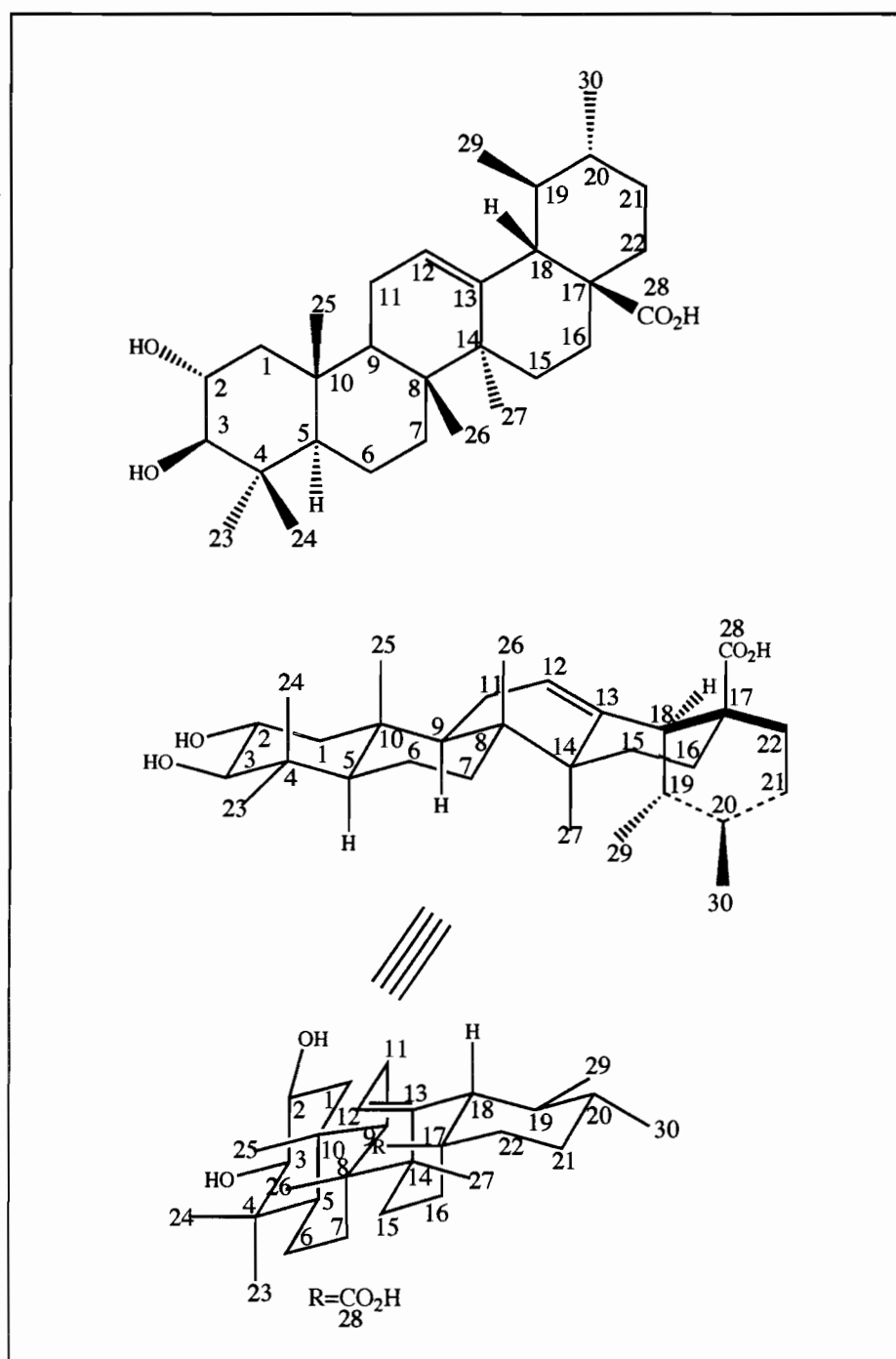
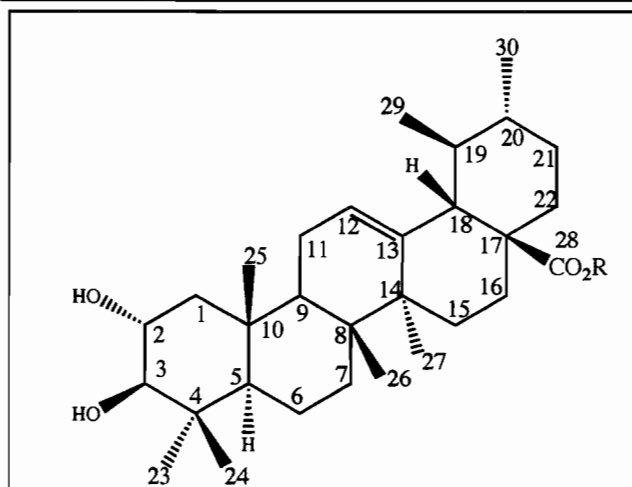


FIGURE # 32. Représentation des différentes structures tridimensionnelles de C5.

Atome	¹³ C-RMN [ppm] C5a	¹³ C-RMN [ppm] Corosmato de méthyle
1	46.5	46.5
2	68.5	68.9
3	83.4	83.9
4	39.2	39.2
5	55.3	55.4
6	18.3	18.3
7	32.9	32.9
8	39.5	39.4
9	47.5	47.6
10	38.0	38.3
11	23.3	23.4
12	125.2	125.4
13	138.7	138.3
14	42.1	42.1
15	28.0	28.0
16	24.2	24.2
17	47.8	48.1
18	52.8	52.9
19	39.1	39.1
20	38.9	38.9
21	30.6	30.7
22	36.8	36.6
23	28.5	28.6
24	16.8	16.8
25	16.5	16.8
26	16.6	17.0
27	23.4	23.6
28	180.5	178.2
29	16.8	17.0
30	21.0	21.1
CH ₃	-	51.4



TABEAU # 30. Comparaison de données de ¹³C-RMN de C5a et du corosmate de méthyle (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃).

2. Données de Spectrométrie de Masses (EM)

a) Ionisation chimique directe (DCI)

Le spectre DCI de C5 présente un ion à $m/z = 490$ correspondant à l'ion moléculaire plus le gaz de ionisation (NH_3). L'ion moléculaire apparaît à $m/z = 473$ ($\text{M} + \text{H}^+$) et à partir duquel moyennant une fragmentation du type rétro Diels Alder les ions à $m/z = 248$ sont engendrés. Nous aussi observons un signal à $m/z = 455$ ($473 - \text{H}_2\text{O}$) et un autre à $m/z = 446$ ($490 - \text{CO}_2$).

b) Impact électronique (EI)

Le spectre d'EI, ne présente pas l'ion moléculaire de C5 à $m/z = 472$ mais on voit le fragment provenant de sa fragmentation moyennant la rupture rétro Diels Alder: $m/z = 248$. Dans le spectre EI, également on observe les signaux à $m/z = 203$ et $m/z = 189$. Le premier, $m/z = 203$, vient du fragment 248 moins trois CH_3 , [$248 - 3 \text{CH}_3$]. Le deuxième, $m/z = 189$, prend son origine de [225 (l'autre fragment provenant du rétro Diels Alder du pic moléculaire) - $2 \text{H}_2\text{O}$]. L'origine de ces fragments est égale à celle indiquée auparavant pour C3 dans la Figure # 27 avec l'ajout d'un hydroxyle sur le carbone 2.

3. Données d'Infra Rouge (IR)

Sur le spectre IR de **C5**, on apprécie une large bande centrée à 3414 cm^{-1} propre des vibrations de tension des OH des acides et alcools. Les signaux à 2928 cm^{-1} (vibrations de tension C-H en méthyles et alcanes), 2859 cm^{-1} (vibrations de tension C-H alcanes), 1690 cm^{-1} (vibrations de tension CO), 1457 cm^{-1} (vibrations de déformation antisymétrique de CH_3 y CH_2 en groupes alkyles), 1384 cm^{-1} (vibrations de torsion symétrique de CH_3 en groupes alkyles) et 617 cm^{-1} (vibrations de déformation de type ciseau, bending, en O-C=O).

4. Données de Rotation Spécifique ($[\alpha]_D^{25}$)

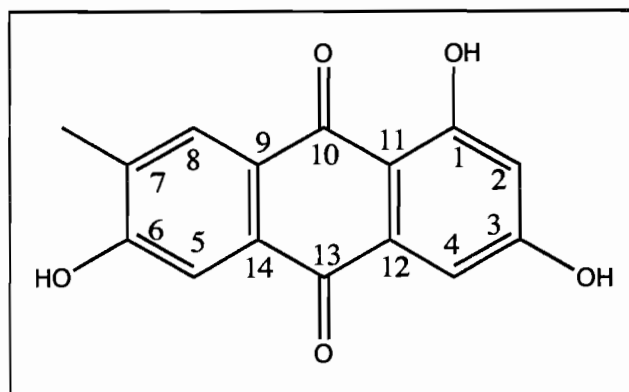
Nous avons préparé une solution de **C5** à $c\ 0.1$ dans le CHCl_3 et nous avons utilisé une cuvette de 0.1 cm de large, à 25°C et à 589 nm . Le polarimètre a mesuré une rotation observée de $+0.025^\circ$. Moyennant l'équation: $[\alpha]_D^{25} = \alpha / cl$, nous avons obtenu une rotation spécifique égale à $+25^\circ$.

Conclusion: Le composé **C5** est l'acide corosolique sur la base du travail d'élucidation structurale à partir de l'analyse des données spectrales enregistrées.

2. Composé actif isolé de *Rumex obtusifolius* L (Polygonaceae)

A. Composé C6: déméthylmacrosporine I

Le composé C6 se présente sous la forme d'un cristal orange. L'analyse des expériences de RMN et SM a permis l'établissement de sa structure qui correspondrait à l'isomère de la déméthylmacrosporine, ou déméthylmacrosporine I:



1. Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

a) Résonance Magnétique du proton (^1H -RMN)

Le spectre de résonance magnétique nucléaire du proton de C6 montre clairement deux types de protons: les protons aromatiques présents à bas champs et des protons de type alcane à haut champs. Les protons aromatiques ont des déplacements chimiques à 7.50 ppm (1H, d, $J = 1.3\text{ Hz}$, H-5); 7.14 ppm (1H, d, $J = 2.4\text{ Hz}$, H-4); 6.98 ppm (1H, d, $J = 0.7\text{ Hz}$, H-8) et 6.53 ppm (1H, d, $J = 2.4\text{ Hz}$, H-2). Les constantes de couplage de 2.4 Hz sont propres à un système de protons aromatiques en position "meta" suggérant que les protons à 7.14 et 6.53 ppm (H-4 et H-2) couplent et se

trouvent en position meta. De leur côté, les protons à 7.50 y 6.98 ppm (H-5 et H-8) présentent des couplages typiques de protons en position “para” en concluant que ces protons couplent ensemble et se trouvent sur un autre anneau aromatique en position para. Le singulet intense se trouve à champs fort à 2.36 ppm (3H, s, H-15), ce signal est propre à un méthyle uni à un groupe qui est déblindé par rapport à la région où normalement il résonne. Ce groupe déprotecteur peut être un carbonyle ou une insaturation alcénique ou aromatique, le signe à 2.36 ppm (H-15) correspondrait donc à CH_3CO ou à $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$ ou CH_3Ar .

b) Résonance Magnétique du carbone, J-MODulated spin-echo experiment (^{13}C -JMOD-RMN)

Le spectre de résonance magnétique nucléaire du carbone de **C6** montre 15 carbones: un CH_3 , 4 CH y 10 signaux correspondant à des carbones quaternaires et / ou CH_2 . Le signe correspondant à un méthylène à 22.1 ppm (C-15) suggère que cet alcane se trouve uni à un carbonyle ou à un ester ou à un alcène ou à un groupe aromatique résultant: $\text{CH}_3\text{CO}-$ o $\text{CH}_3\text{COO}-$ o $\text{CH}_3\text{CR}=\text{}$ o CH_3Ar . Les signaux correspondant aux CHs: 108.6, 109.6, 121.2 et 124.5 ppm correspondent à des protons aromatiques (C-2, C-4, C-5, C-8). Des signaux les plus déblindés, il est important de souligner ceux dont les déplacements chimiques à 182.7 y 190.2 ppm seraient dus à des acides ou à des carbonyles aromatiques (C-13, C-10). Les trois signaux qui apparaissent à 165.6, 164.8, 163.0 ppm correspondent à des carbones quaternaires oxygénés (C-1, C-3, C-6). Finalement, les carbones à 135.4, 133.3, 114.0 et 110.0 ppm sont des carbones de fusion de cycle (C-12, C-9, C-14, C-11).

**c) Corrélation hétéronucléaire directe: Heteronuclear Simple
Quantum Correlation (HSQC)**

Le Tableau # 31 contient les assignations provenant du spectre HSQC de C6.

Atome	Carbone [ppm]	Proton [ppm]	Groupe fonctionnel
15	22.1	2.36	CH ₃ CO o CH ₃ Ar
2	108.6	6.53	CH (Ar en meta)
4	109.6	7.14	CH (Ar en meta)
5	121.2	7.50	CH (Ar en para)
8	124.5	6.98	CH (Ar en para)
11	110.0	-	Cq-CH ₃
14	114.0	-	Cq
9	133.3	-	Cq
12	135.4	-	Cq
7	148.3	-	Cq
6	163.0	-	Cq-O- o Cq-OH
3	164.8	-	Cq-O- o Cq-OH
1	165.6	-	Cq-O- o Cq-OH
13	182.7	-	COOH o CO en (Ar)
10	190.2	-	COOH o CO en (Ar)

TABLEAU # 31. Assignations des carbones et protons de C6 moyennant l'analyse du spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD-CDCl₃).

En réunissant l'information obtenue des spectres de proton, carbone et HSQC, nous concluons que la molécule en question possède 15 carbones, 7 hydrogènes et 5 oxygènes, ce qui nous donne un poids moléculaire de 267. L'information obtenue du spectre de masse d'Impact Electronique (IE) présentée plus loin donne un poids moléculaire de 270 umas. Pour arriver à ce poids moléculaire, il nous manque trois umas qui correspondraient à trois hydrogènes. La formule moléculaire de notre composant serait donc C₁₅H₁₀O₅ avec un degré d'insaturation de 11. Un type de

molécules qui possède ce degré élevé d'insaturation, produit par 3 anneaux aromatiques fusionnés et 2 carbonyles, sont les anthraquinones.

d) Corrélations hétéronucléaires et homonucléaires scalaire:

Heteronuclear Multiple- Bound Correlation (HMBC) et

Correlated Spectroscopy (COSY)

Le Tableau # 32 présente les corrélations HMBC en partant des protons de C6. Dans ce spectre, on peut mesurer des couplages 2J , 3J et même 4J . Plusieurs des corrélations à travers les 4 liaisons sont confirmées par le spectre de COSY. De plus, il existe des publications qui donnent leur validité à ces corrélations de longue distance (4J) comme celles trouvées dans Araya- Maturana et al. en 2001.

Atome	Proton [ppm]	Corrélation à 2J	Corrélation à 3J	Corrélation à 4J
15	2.36	148.3 (H-7)	124.5 (H-8)	121.2 (H-5)
2	6.53	165.6 (H-1) 164.8 (H-3)	109.6 (H-4)	190.2 (H-10)
8	6.98	-	114.0 (H-14) 163.0 (H-6) 22.1 (H-15)	121.2 (H-5)
4	7.14	135.4 (H-12)	108.6 (H-2) 182.7 (H-13)	190.2 (H-10) 165.6 (H-1)
5	7.50	114.0 (H-14)	182.7 (H-13) 190.2 (H-10)	124.5 (H-8) 22.1 (H-15)

TABLEAU # 32. Corrélations hétéronucléaires provenant du spectre HMBC de C6 (400 MHz, CD₃OD-CDCl₃).

Les corrélations qui partent des protons H-15, H-8 et H-5 nous donnent l'information relationnelle sur l'un des cycles aromatiques de **C6**, lequel sera appelé cycle A. À partir des corrélations observées sur les protons à 2.36 ppm (H-15), nous pouvons indiquer que ce groupe méthyle se trouve sur le même cycle aromatique porteur des protons en position para (H-5 y H-8). Il est en plus séparé par deux liaisons du carbone non oxygéné plus déblindé (C-7). Parmi les corrélations observées en partant du proton à 6.98 ppm (H-8), il est important de noter celles qui sont en relation avec le C-6 et le C-14. Le C-6 correspond à un carbone quaternaire oxygéné, ce qui indique que le cycle A possède un alcool. Le C-14 correspond à un carbone quaternaire de fusion de cycle assez déblindé. Finalement, on observe également des corrélations entre H-5 (7.50 ppm), le C-14 et les carbones de type carbonyle aromatiques C-13 y C-10. La Figure # 33 présente les corrélations HMBC en partant des protons H-15, H-8 et H-5 sur le cycle aromatique A.

Les corrélations qui partent des protons H-2 et H-4 nous donnent l'information en relation avec le deuxième cycle aromatique ou cycle B. Des signaux qui partent du proton à 6.53 ppm (H-2), nous pouvons indiquer celui qui est en relation avec le carbone C-4 qui porte un proton avec un couplage "meta". De même, on remarque une tache de corrélation avec le carbonyle C-10 et d'autres taches de corrélation avec les carbones quaternaires oxygénés C-1 y C-3. Cette information nous indique que sur le cycle B, il y a des protons en distribution "meta" et 2 groupes hydroxyles. Finalement, parmi les signaux importants de corrélation pour H-4 (7.14 ppm) se trouvent les couplages avec le carbone quaternaire de fusion d'anneau C-12, le carbone quaternaire oxygéné C-1 et les deux carbonyles C-13 et C-10. La Figure # 34 présente les corrélations HMBC en partant des protons H-4 y H-2 sur le cycle aromatique B.

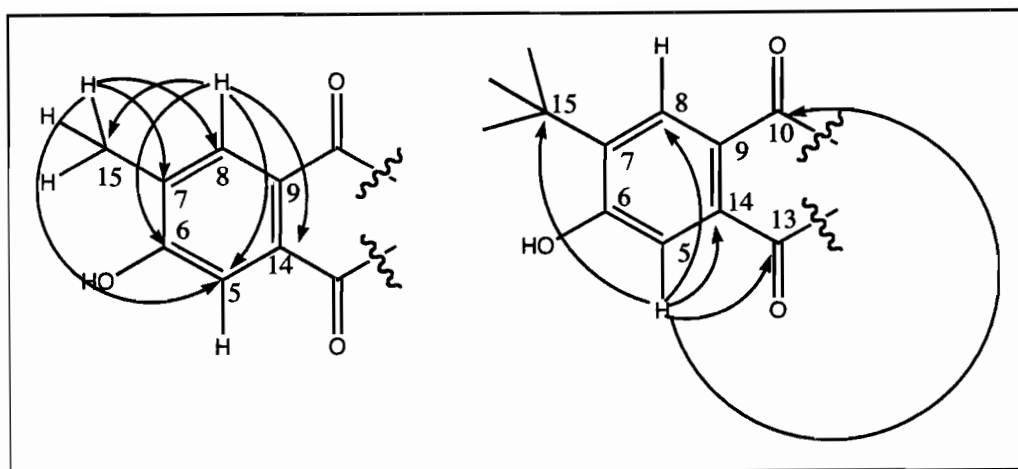


FIGURE # 33. Corrélations HMBC existantes sur le cycle aromatique A de C6.

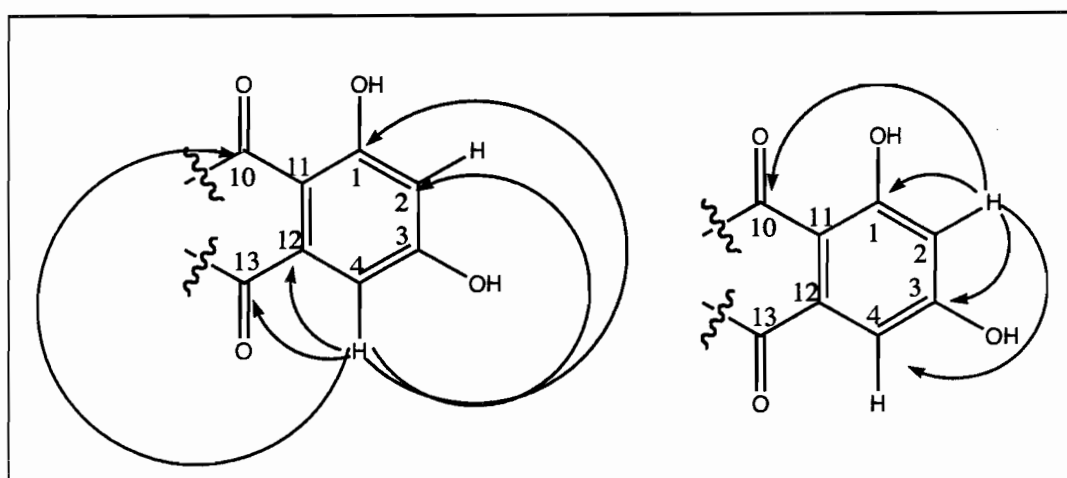


FIGURE # 34. Corrélations HMBC existantes sur le cycle aromatique B de C6.

Le spectre COSY de **C6** confirme les corrélations des protons aromatiques. Dans le spectre, on remarque un signal de corrélation isolé pour les protons “meta” H-2 et H-4 confirmant l’existence de ce système dans le cycle B. En même temps, on observe la corrélation “para” entre les protons H-8 y H-5 et les corrélations provenant de ces protons aromatiques avec les protons méthyliques H-15 dans le cycle A.

L’information spectroscopique réunie nous permet de proposer pour **C6** la structure de l’anthraquinone dessinée dans la Figure # 35.

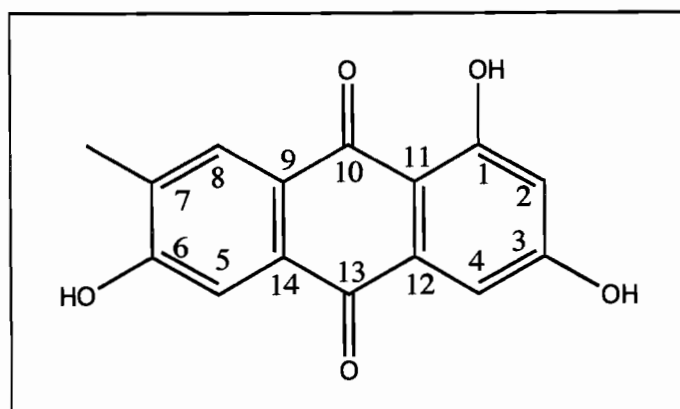


FIGURE # 35. Anthraquinone correspondant à C6.

Il est important de souligner la formation d'un système "peri" dans la molécule grâce à la chélation de l'hydroxyle par le C-1 et le carbonyle en C-10. Dans ce système "peri" on apprécie le carbone C-11 très blindé par rapport aux autres carbones quaternaires. Le même effet explique la résonance du C-1 à champs très bas face aux autres carbones quaternaires oxygénés. Une autre observation importante sur le spectre du proton justifie le déplacement chimique de H-2 face à H-4. Le proton H-2 résonne à un champs plus élevé dû à ce que ce dernier se trouve proche de deux hydroxyles, lesquels sont des groupes donneurs d'électrons en positions "ortho" et "para". Une explication semblable est applicable au signal blindé de H-8 face à H-5.

Il est important d'indiquer que l'anthraquinone dessinée dans la Figure # 35 possède un isomère non discernable avec les techniques de RMN utilisées. La Figure # 36 présente les deux isomères que l'on appellera isomère 1 et isomère 2. La biosynthèse possible de ce type d'anthraquinones confirme l'existence de ces deux isomères. La biosynthèse d'isomère 1 moyennant le processus classique à partir d'un polykétide de 8 unités carbonyles qui donne la biosynthèse de l'émodine [Mann, 1992]. La Figure # 37 présente cette biosynthèse de l'isomère 1. La biosynthèse de l'isomère 2 pourrait

venir de l'adaptation de la biosynthèse de l'acide norsolorinique [Mann, 1992]. La Figure # 38 présente cette biosynthèse de l'isomère 2.

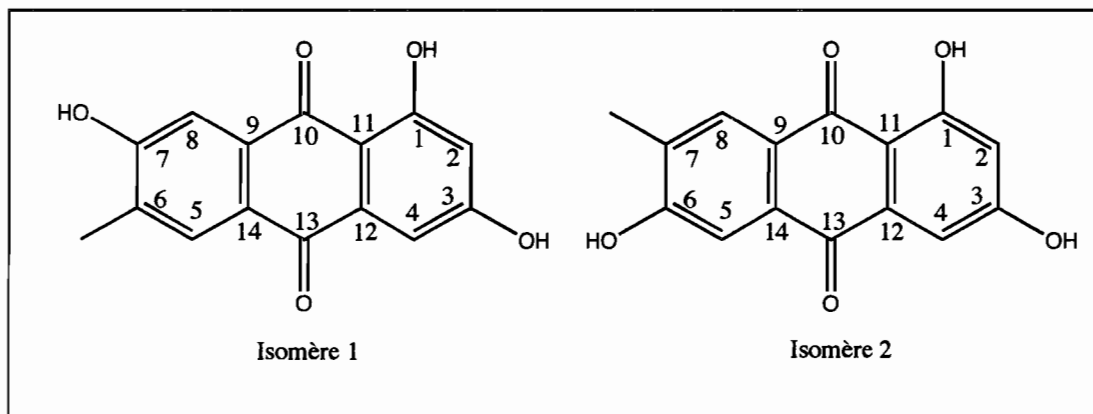


FIGURE # 36. Formes isomériques de l'anthraquinone correspondant à C6.

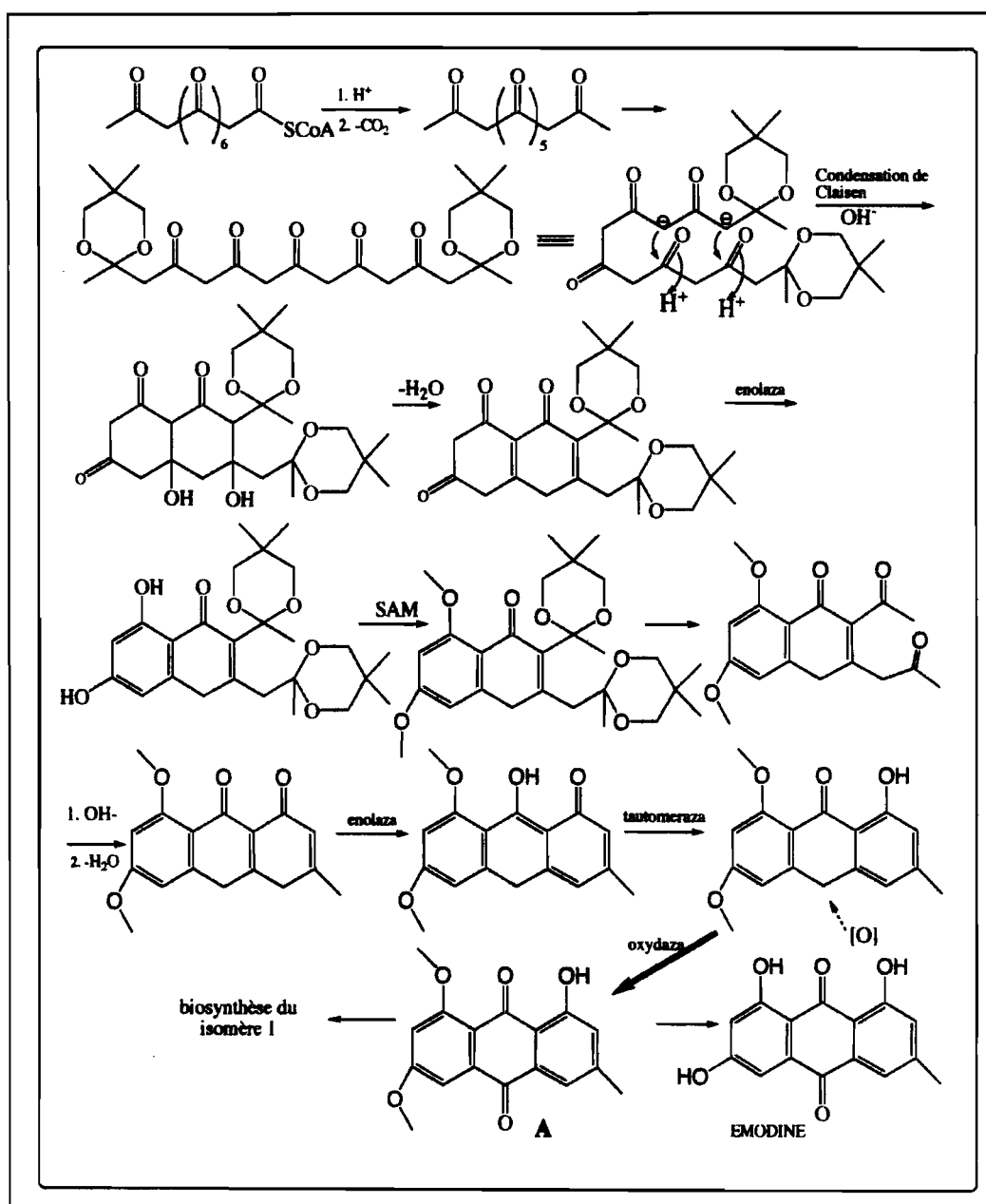


FIGURE # 37. Possible biosynthèse de l'isomère 1 de C6.

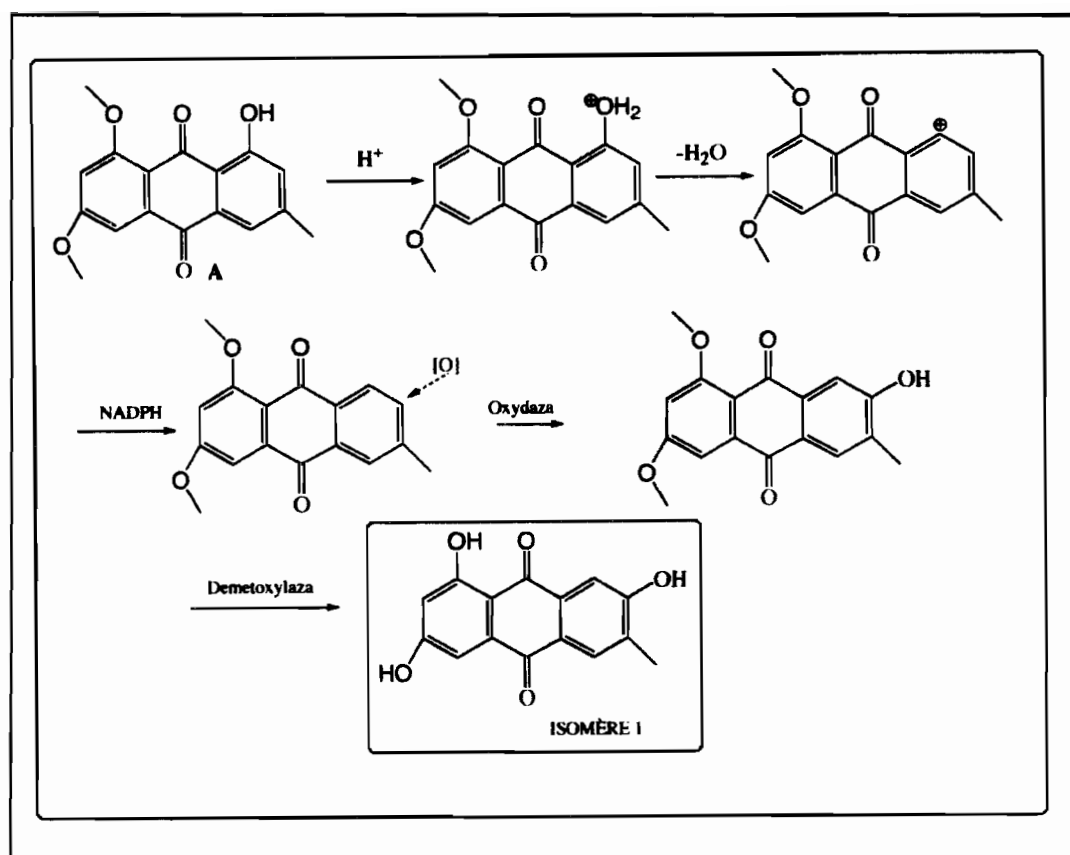


FIGURE # 37. Suite. Possible biosynthèse de l'isomère 1 de C6.

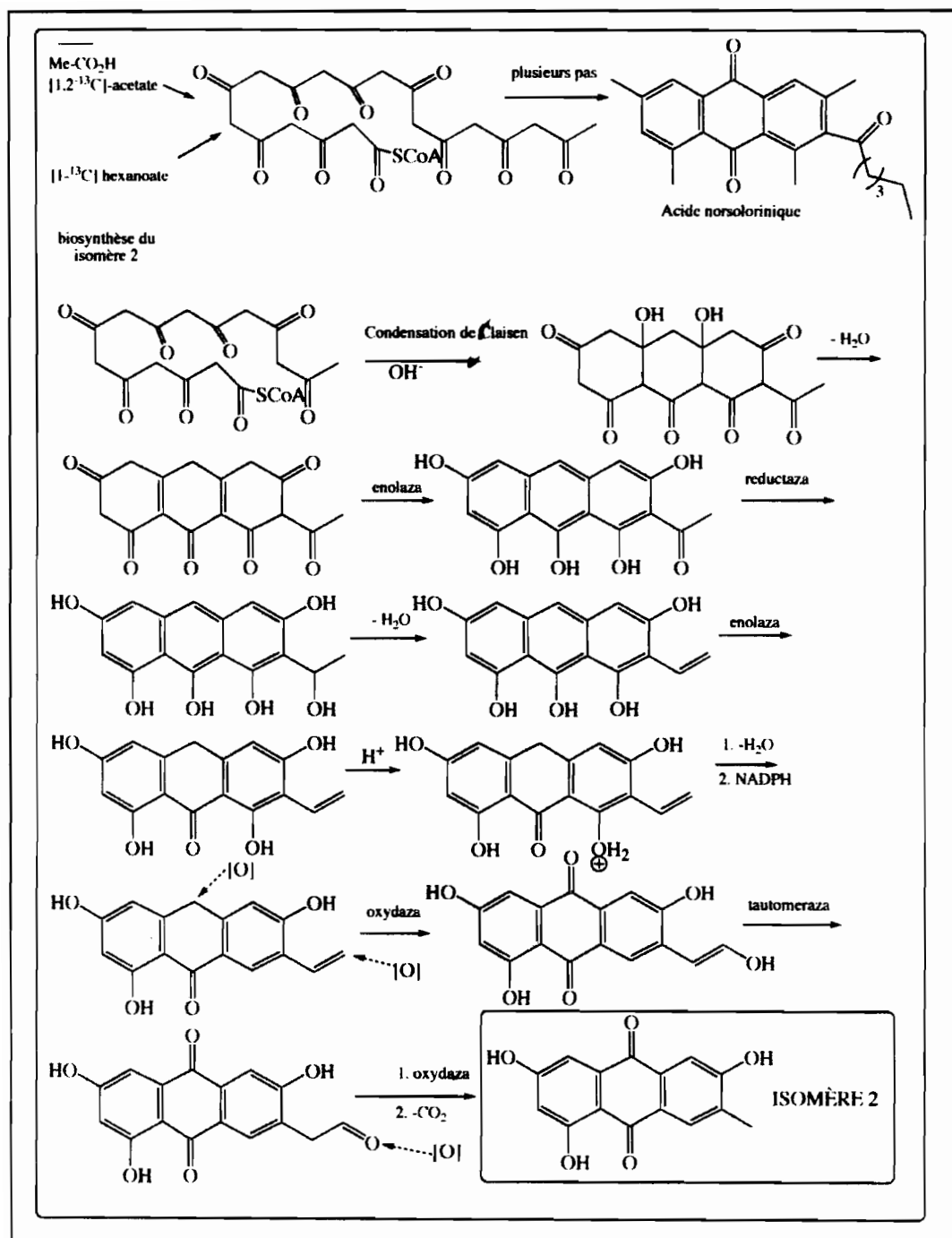


FIGURE # 38. Biosynthèse possible de l'isomère 2 de C6.

Une révision bibliographique nous indique que l'isomère 1, ou déméthylmacrosporine, a été isolée de *Dichotomophthora lutea* et son élucidation structurale a été faite par ^1H -RMN [Hosoe et al., 1990]. La comparaison des déplacements chimiques dans les spectres de proton de l'antraquinone isolée de *Rumex obtusifolius* et ceux reportés par Hosoe et ses collaborateurs sont différents. Les signaux sont présentés dans le Tableau # 33. Dans ces spectres, il faut remarquer le signal à 12.1 ppm qui correspond au proton de l'alcool en C-1. Ce proton, du fait de la chélation, est déblindé.

Le travail présenté dans cette thèse est un apport à l'étude structurale de cette antraquinone. Hosoe et ses collaborateurs ont élucidé la structure de la déméthylmacrosporine en se basant sur ^1H -RMN et en ne publiant pas l'utilisation d'autres techniques convaincantes pour différencier les isomères préalablement indiqués, on pourrait discuter l'assignation réalisée par le groupe japonais. Une de ces techniques serait la diffraction des Rayons X (DRX). En conséquence, dans le but de trouver une solution à l'ambiguïté entre les isomères de l'antraquinone séparée, nous avons réalisé plusieurs tentatives de cristallisation pour soumettre le composé C6 à la DRX, cependant les essais ne furent pas encourageants car C6 cristallise sous forme d'éventails très fins, structure cristalline non adéquate pour les expériences de DRX.

Une autre observation importante est que ce type d'antraquinone est rare dans les plantes (ou on rencontre plutôt des dihydroxyl-1,8-antraquinone) et se trouve plutôt présente dans les champignons.

PROTON	δ [ppm] de l'anthraquinone de <i>Rumex obtusifolius</i>	δ [ppm] de l'anthraquinone de <i>Dichotomophthora lutea</i>
2	6.5	6.6
4	7.1	7.1
5	7.5	7.9
8	7.0	7.6
CH ₃	2.4	2.3
OH-1	12.1	12.8

TABLEAU # 33. Comparaison des déplacements chimiques en ¹H-RMN des anthraquinones séparées de *Rumex obtusifolius* et de *Dichotomophthora lutea* (250 MHz, DMSO).

La Figure # 39 présente la structure de l'isomère du composant publié par Hosoe et al. (déméthylmacrosporine). Nous appellerons cet isomère la déméthylmacrosporine I.

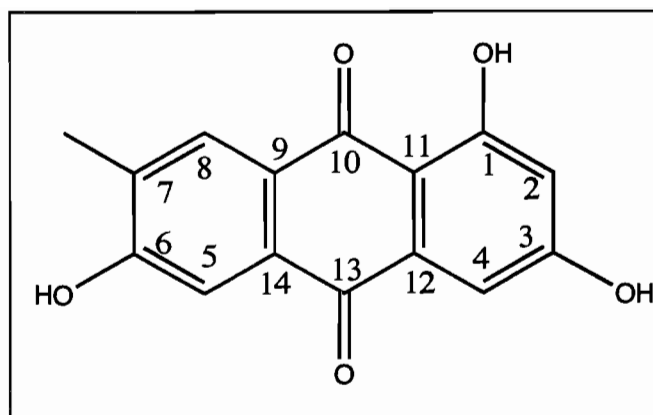


FIGURE # 39. Structure du composé C6, Déméthylmacrosporine I.

2. Données de Spectrométrie de Masses (EM)

a) Impact électronique (EI)

Le spectre de masse par Impact Electronique (IE) de **C6** présente l'ion moléculaire à $m/z = 270$ qui correspond à une formule moléculaire de $C_{15}H_{10}O_5$ avec un degré d'insaturation de 11. Ces données spectrométriques sont en relation avec la structure d'un composé de type déméthylmacrosporine. Les composants cycliques avec un haut degré d'insaturation, comme les anthraquinones, présentent la propriété de perdre un carbonyle CO (28 uma). Si la molécule contient plusieurs groupements CO, ceux-ci peuvent être éliminés de façon consécutive. Dans **C6**, on remarque l'élimination de carbonyles grâce à la présence de fragments à $m/z = 242, 214$. La Figure # 40 présente le schéma des fragmentations. Les signes à $m/z = 43, 57, 69, 84, 128, 185$ peuvent être déduits des fragmentations de la molécule entière alors que celles à $m/z = 139, 149, 167$ proviennent de fragmentations de la molécule décarbonylée. Les Figures # 41 et 42 présentent ces ruptures.

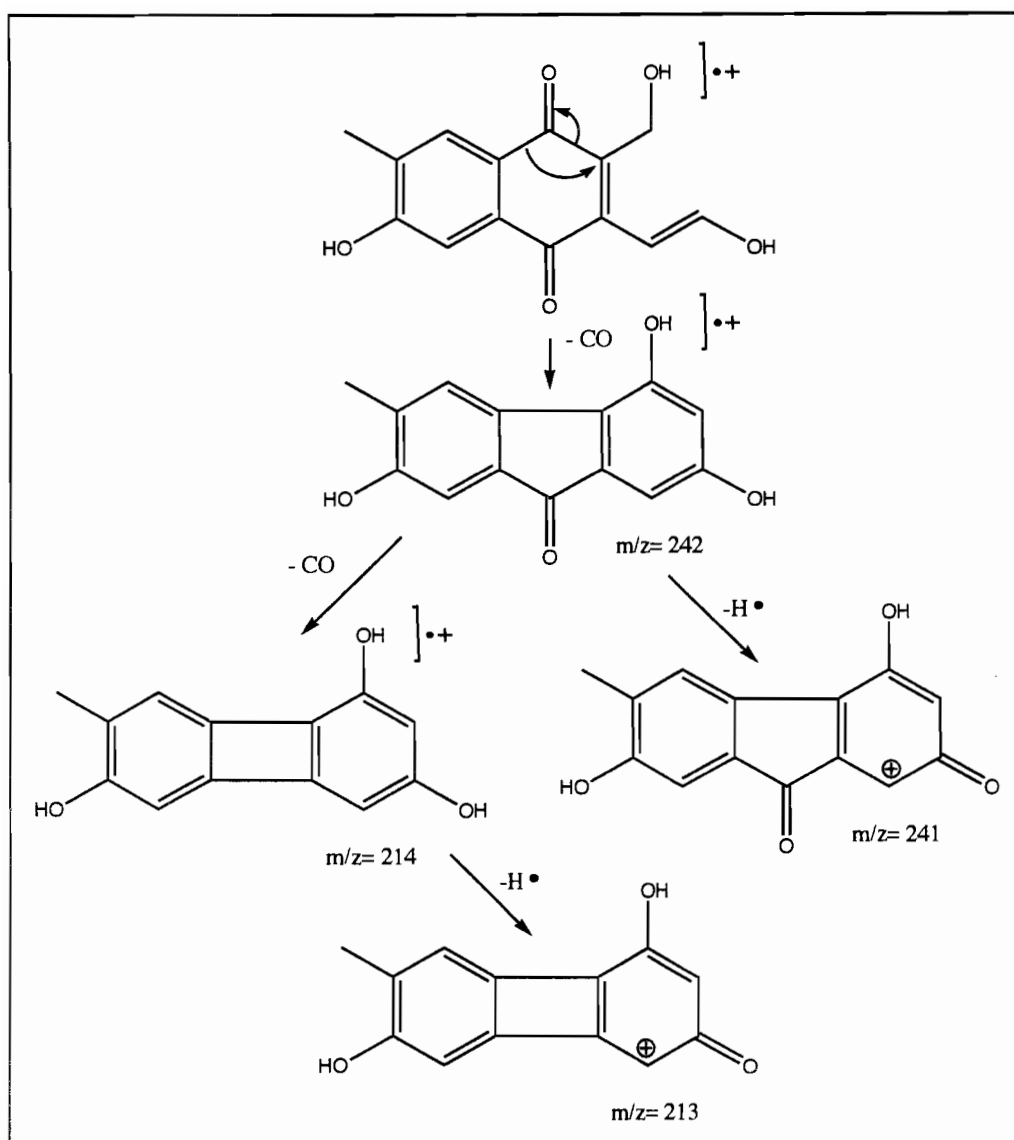


FIGURE # 40. Fragmentations de décarboxylation en C6.

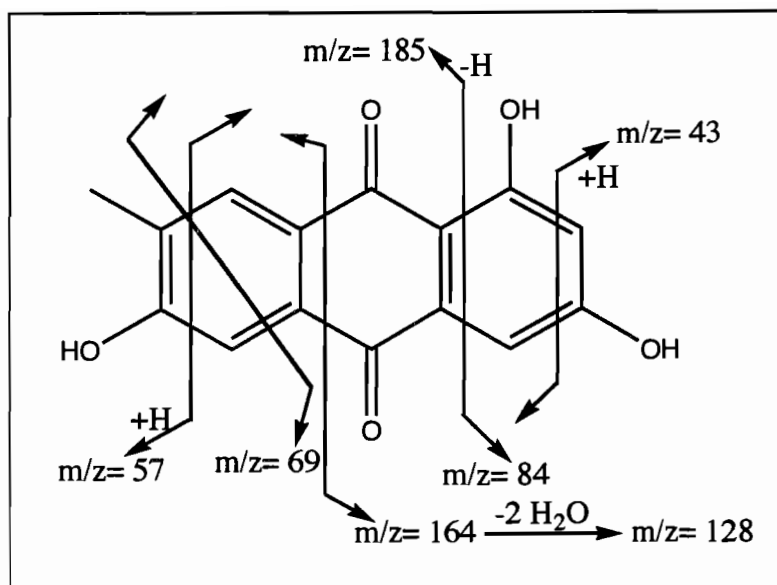


FIGURE # 41. Fragmentations proposées à partir de C6.

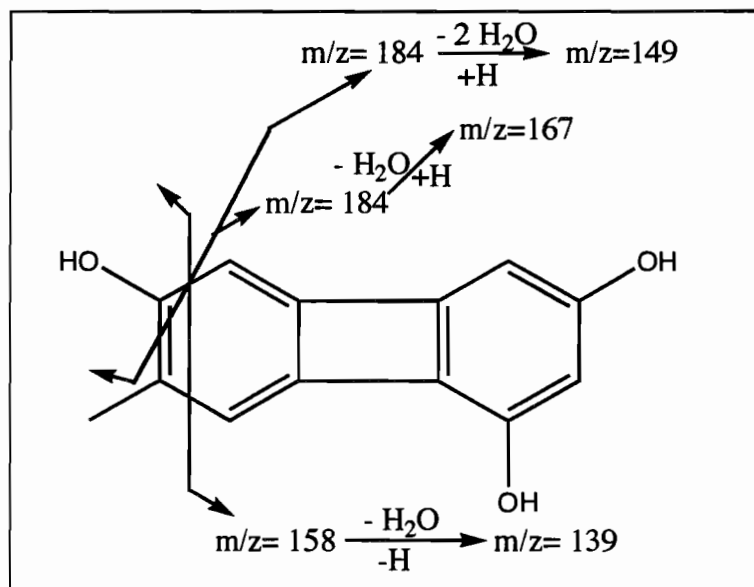


FIGURE # 42. Fragmentations proposées à partir de C6 décarbonylé.

Conclusion Le composé **C6** pourrait être l'isomère du composant publié par Hosoe et al. (déméthylmacrosporine). Les études de RMN que nous avons réalisées n'aident pas à résoudre cette ambiguïté. Cependant, quelle que soit la structure du composant **C6**, il est rare de reporter dans une plante ce type d'anthraquinone. Sur ce point, il est important d'indiquer que les travaux de collecte et de préparation de la plante ont été réalisés adéquatement pour éviter des contaminations bactériennes ou fongiques. On a programmé des études de diffraction de rayons X pour pouvoir différencier quel isomère s'était isolé de *Rumex obtusifolius*. Cependant, on n'a pas pu obtenir des cristaux adéquats de **C6** pour ce type d'expérience. L'ambiguïté entre les deux isomères pourrait être levée moyennant l'utilisation de programmes de modélisation moléculaire en RMN. Avec cette technique informatique, on pourrait calculer les déplacements chimiques des protons en position "para" dans chaque isomère permettant ainsi de les différencier.

3.Composé actif isolé de *Gustavia augusta* (Lecythidaceae)

A.Composé C7: alcool gras

Le composé **C7** se présente sous la forme d'un solide blanc. L'analyse des expériences de RMN et SM a permis l'établissement de sa structure qui correspond à l'alcool gras: $C_{37}H_{72}O$.

1. Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

a) Résonance Magnétique du proton (1H -RMN)

Le spectre de proton présente clairement un spectre typique d'un alcool ou d'un acide gras. Dans le spectre, on remarque un grand signal intégrant pour de nombreux protons à champs fort, propre des méthylènes de longues chaînes insaturées. On observe également, un multiplet propre à un système méthylénique uni à un groupe électro-négatif comme dans le cas d'un alcool vers 3.5 ppm et des signaux éthyléniques à 5.1 ppm. Les données obtenues du spectre nous suggèrent donc que le composé est un alcool gras insaturé.

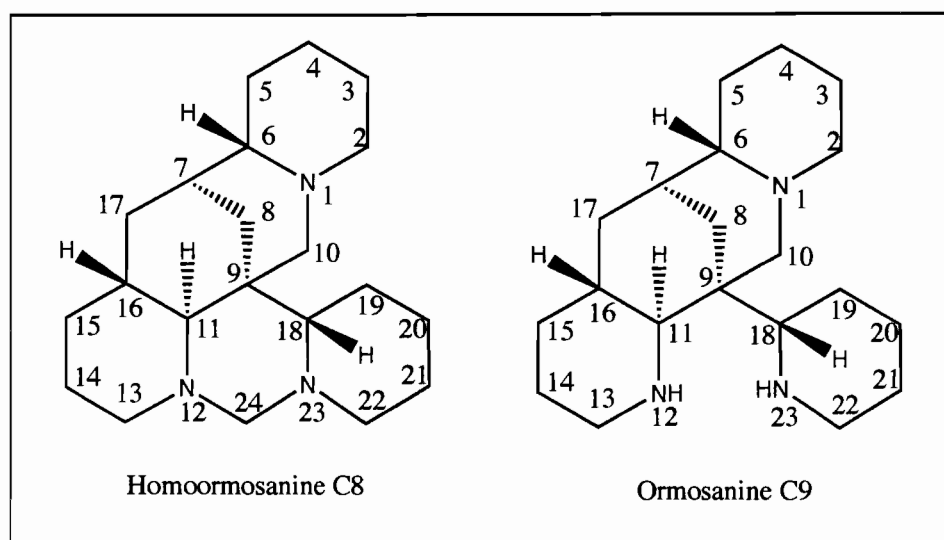
2. Données de Spectrométrie de Masse (EM)

Le spectre de masse par impact électronique (EI) de **C7** présente 2 pics à m/z 531 et 516. Cependant, le spectre de masse d'ionisation chimique directe (DCI) présente un seul pic à m/z 549 (MNH_4^+).

Conclusion: Grâce a les données étudiées, nous attribuons au composé **C7** la formule de l'alcool gras $C_{37}H_{72}O$.

4. Composés actifs isolés de *Bowdichia virgiloides* (Leguminosae)

Les composés **C8** et **C9** se présentent sous la forme de solides oranges. L'analyse des expériences de RMN et SM a permis l'établissement des structures qui correspondent à l'homoomosanine (**C8**) et à l'ormosanine (**C9**).



1. Données de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

a) Résonance Magnétique du proton (^1H -RMN)

La recherche bioguidée a permis l'isolement de six alcaloïdes. Parmi les six, deux ont été identifiés en enregistrant leurs spectres de ^1H -RMN et de masse d'IE et en comparant avec les données de la littérature. La réalisation des spectres de RMN en deux dimensions a permis aussi l'établissement d'un certain nombre d'aspects structuraux complémentaires pour deux de ces produits.

L'alcaloïde **C8** a été identifié, d'après l'analyse comparative avec la littérature des signaux de ^1H -RMN et de ^{13}C -JMOD comme étant l'homormosanine [Torrenegra et al., 1985].

Parmi les six alcaloïdes décrits par la littérature dans *B. virgiloides* cinq ont été classifiés d'après leur polarité croissante: homo-18-epiormosanine (R_f 0,73), homopiptanthine (R_f 0,69), homormosanine (R_f 0,60), ormosanine (R_f 0,39), piptantine (R_f 0,39) [Torrenegra et al., 1985, Torrenegra et al., 1989 et Marinho et al., 1994]. Notre deuxième alcaloïde, **C9**, a une polarité supérieure à **C8**, donc il peut bien s'agir soit de l'ormosanine, soit de la piptantine. La (-)-podopétaline reste exclue dû à l'absence des signaux correspondants aux carbones sp^2 ($\text{C}=\text{CH}$) dans le spectre de ^{13}C -RMN de **C9**. Le spectre de ^1H -RMN de **C9** ne présente pas de signal éthylénique. La comparaison des données de ^{13}C -RMN de l'ormosanine et du composé **C9** permet d'établir que le composé **C9** possède la structure de l'ormosanine. Le Tableau # 34 présente la comparaison des données de **C8** et **C9** avec la littérature [Torrenegra et al., 1985].

Nombre	¹³ C-RMN [ppm] ¹ Homoormosanine	¹³ C-RMN [ppm] ¹ C8	¹³ C-RMN [ppm] ¹ Ormosanine	¹³ C-RMN [ppm] ¹ C9
2	55,5	55.7	55,2	55.2
3	25,6	25.7	26,8	26.8
4	25,0	25.1	25,3	25.3
5	32,1	32.1	32,1	32.0
6	64,9	65.1	63,8	63.8
7	34,5	34.5	35,4	35.4
8	30,0	30.1	30,7	30.6
9	36,5	36.5	39,3	39.3
10	63,3	63.4	56,1	56.0
11	66,7	66.7	66,1	66.1
13	53,2	53.3	47.0	47.0
14	25,5	25.5	26,6	26.5
15	-	35.4	33,2	33.2
16	31,6	31.6	34,1	34.1
17	37,9	37.9	38,0	38.0
18	68,2	68.3	66,6	66.6
19	19,8	19.9	26,8	26.8
20	16,5	16.5	24,0	24.0
21	25,0	25.1	25,6	25.6
22	53,4	53.5	48,1	48.2
24	69,8	70.0		

¹: CDCl₃

TABLEAU # 34. Données de ¹³C-RMN de C8, C9, Homoormosanine et Ormosanine.

L'attribution des signaux des protons est rendue possible par l'analyse des spectres HSQC des deux composés. Le Tableau # 35 montre les corrélations ¹J (¹H à ¹³C) de **C8** et **C9** lues sur les spectres HSQC.

Numérotation	¹³ C-RMN [ppm] ¹ C8	¹ H-RMN [ppm] ¹ C8	¹³ C-RMN [ppm] ¹ C9	¹ H-RMN [ppm] ¹ C9
2	55.7	2,88 (d) ² 2,02 (td) ³	55.2	2,82 (d) ² 2,20 (dd) ³
3	25.7	1,89 (d) ² 1,60 (m) ³	26.8	1,53 (d) ² 1,33 (m) ³
4	25.1	1,74 (d) ^{2,4} 1.32 (m) ^{3,4}	25.3	1.51 (d) ² 1.30 (m) ³
5	32.1	1.60 (d) ² 1,00 (ddd) ³	32.0	1,37 (dd) ³ 1.29 (d) ²
6	65.1	1,73 (d) ³	63.8	1,96 (dd) ³
7	34.5	1,61 (m) ²	35.4	1,58 (d) ²
8	30.1	1,68 (d) ³ 0,87 (d) ²	30.6	1,64 (dd) ³ 1,1,06 (d) ²
9	36.5	-	39.3	-
10	63.4	2,70 (d) 2,63 (d)	56.0	2.58 (dd) ² 2,54 (dd) ³
11	66.7	2,76 (d) ³	66.1	2.24 (d) ³
13	53.3	2,78 (d) ² 1,96 (td) ³	47.0	3,07 (d) ² 2,55 (dd) ³
14	25.5	1,89 (d) ² 1,44 (m) ³	26.5	1,58 (m) 1,49 (m)
15	35.4	1,53 (d) ² 1,34 (m) ³	33.2	1,66 (d) ² 1,03 (dd) ³

¹: CDCl₃

²: H- équatorial

³: H- axial

⁴: Tache interchangeable

**TABLEAU # 35. Corrélations des protons et carbones de C8 et C9
moyennant HSQC.**

Numérotation	¹³ C-RMN [ppm] ¹ C8	¹ H-RMN [ppm] ¹ C8	¹³ C-RMN [ppm] ¹ C9	¹ H-RMN [ppm] ¹ C9
16	31.6	1,83 (m)	34.1	2,00 (m) ³
17	37.9	1,40 (d) ² 1,08 (dt) ³	38.0	1,41 (d) ² 1,04 (dd) ³
18	68.3	1,47 (d) ³	66.6	2,40 (d) ³
19	19.9	1,64 (dd) ³ 1,12 (d) ²	26.8	1,72 (d) ² 1,17 (dd) ³
20	16.5	1,81 (dd) ³ 1,20 (d) ²	24.0	1,43 (d) ² 1,58 (m) ³
21	25.1	1,66 (m) ⁴	25.6	1,84 (d) ² 1,31 (m) ³
22	53.5	3,00 (d) ³ 2,90 (dd) ³	48.2	3,17 (d) ² 2,48 (dd) ³
24	70.0	3,39 (d) 3,26 (d)	55.2	-

¹: CDCl₃

²: H- équatorial

³: H- axial

⁴: Tache interchangeable

TABLEAU # 35. Suite. Corrélations des protons et carbones de C8 et C9 moyennant HSQC.

L'établissement du squelette hydrocarboné de **C8** et **C9** est possible grâce à la réalisation du spectre HMBC. La Figure # 43 montre la représentation des molécules **C8** et **C9**.

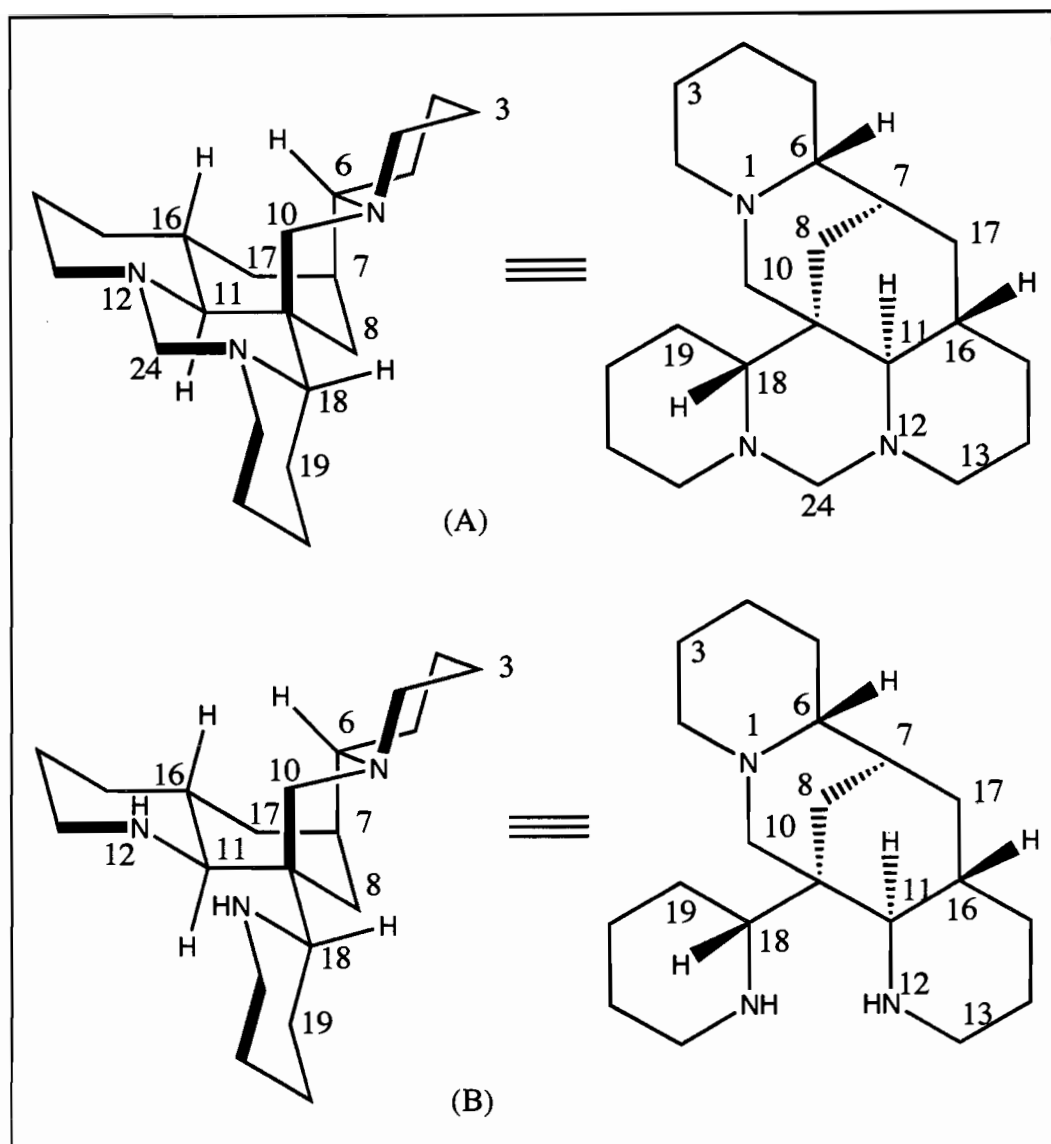


FIGURE # 43. Structures tridimensionnelles de C8 (A) et C9 (B).

2. Données de Spectrométrie de masse

Les données de spectrométrie de masse d'impact électronique résumées dans le Tableau # 36 montrent clairement que le composé **C8** est bien l'homormosanine et le composé **C9** est l'ormosanine.

Homoormosanine¹	C8	Ormosanine¹	C9
329 (100)	329 (94)	317 (28)	317 (36)
247 (11)	247 (9)		
246 (91)	246 (35)		
233 (13)	233 (11)	234 (26)	234 (14)
232 (13)	232 (12)	233 (10)	233 (7)
231 (67)	231 (38)		
217 (11)	217 (6)	219 (44)	219 (18)
205 (10)	205 (4)		191 (7)
164 (19)	164 (9)		
163 (29)	163 (15)		
162 (20)	162 (11)		
150 (28)	150 (15)	151 (32)	151 (15)
149 (37)	149 (15)		149 (3)
148 (26)	148 (17)		
136 (17)	136 (13)		
134 (17)	134 (13)		
123 (8)	123 (11)		
122 (9)	122 (9)		
110 (12)	110 (16)		

¹: [Torrenegra et al., 1989]

TABLEAU # 36. Données d'EI de C8, C9, Homoormosanine et Ormosanine.

Conclusion: Des études présentées, nous concluons que **C8** est l'homoormosanine et **C9** l'ormosanine.

PARTIE VI

TRAVAUX DE RELATION STRUCTURE-ACTIVITE

1. Antécédents

Pendant l'infection parasitaire, la toxine hématine, qui se trouve en équilibre avec son μ -oxo dimère, est transformée par le parasite en une forme cristalline, l'hémozoïne. Portela et collaborateurs ont montré que les molécules du type quinolique et xanthonique interagissent avec ce dimère en le stabilisant grâce aux interactions de longue portée déterminées par des profils électrostatiques complémentaires. Le composant antimalarique agissant de cette manière empêchera l'ajout additionnel des unités d'hématine pour former l'hémozoïne [Portela et al., 2004]. Les centres électroniques du composant antimalarique interagissent avec les pôles opposés trouvés dans l'hématine. Dans l'hème synthétique, le potentiel le plus négatif se localise dans la position occupée par l'atome de fer et le système tétrapyrrolique alors que le potentiel le plus positif se trouve au niveau des groupes propioniques. La taille de ces blocs électrostatiques et la distance entre eux sont essentielles à une stabilisation adéquate de l'hème avec la drogue. Parmi les caractéristiques nécessaires pour qu'un composant de type quinolique et xanthonique puisse présenter une activité sur l'hème, trois sont importantes:

- La présence de deux zones de potentiel négatif qui doivent être séparées par une distance de 9.6- 12.1 Å°.
- La présence d'un potentiel nul ou positif tout au long de la molécule ou du cycle aromatique.

- Les trois potentiels électrostatiques doivent être séparés en formant un triangle dont les côtés doivent être de 9.6-12.1 Å°, 8.7-11.3 Å° y 4.5- 7.6 Å° [Portela et al., 2004].

En nous basant sur le travail de Portela et al., nous présentons une hypothèse de mécanisme d'action pour les molécules identifiées dans cette thèse actives dans le test FBIT.

2. Triterpènes acides séparés de *Brachyotum microdon*.

À partir des feuilles de *Brachyotum microdon*, nous avons réalisé la séparation d'une série de triterpènes acides actifs sur le test FBIT et possédant une activité modérée contre *Plasmodium falciparum*. Le Tableau # 37 présente le résumé des résultats biologiques de ces composants comparés aux contrôles d'origine naturelle et de synthèse.

Composé	FBIT IC ₅₀ (mg/ml)	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (µg/ml)
Acide oléanolique	0.6	96
Acide ursolique	1.6	59
Acide corosolique	0.2	100
Quinine ²	0.03	PT ¹
Chloroquine ²	0.016	0.006

¹PT: Pas testé

²: Produits de contrôle

TABLEAU #37. Résultats des tests FBIT et sur *Plasmodium falciparum* des triterpènes acides séparés de *Brachyotum microdon*.

Un comportement électronique de ces triterpènes peut être proposé sur la base des densités électroniques partielles présentes dans ces molécules. On propose l'existence de deux zones de potentiel négatif localisées sur les groupes acides et alcools

aux extrémités des molécules. De plus, il existe un potentiel positif qui s'ajoute au potentiel nul généré par la double liaison. Ces centres électroniques interagissent avec les forces électrostatiques opposés dans l'hémine synthétique. Le potentiel négatif dans le chlorure d'hémine sera stabilisé par les zones de potentiel neutre et positif du triterpène, alors que le potentiel positif de l'hémine interagira avec celui-ci négatif du triterpène. Une fois que cette interaction stabilisatrice est atteinte, le groupe fonctionnel carboxylique du triterpène réagit avec le fer de l'hème synthétique en déplaçant le chlorure (Cl^-) via une attaque électronique. De cette façon, la liaison de coordination FeOCO est formée. La Figure # 44 présente une représentation schématique hypothétique de la stabilisation du chlorure d'hémine-triterpène et la réaction postérieure pour produire le complexe hématin-terpène via la liaison FeOCO . Nous avons choisi l'acide corosolique comme exemple de cette interaction hème-inhibiteur.

Comme nous l'avons indiqué auparavant, la distance entre les pôles électrostatiques dans la molécule étudiée est importante pour l'activité inhibitrice de la polymérisation de l'hème. Dans la série de la chloroquine, la distance entre les pôles négatifs est de 9.6- 12.1 Å alors que dans les triterpènes acides les centres négatifs se trouvent plus éloignés (distances).

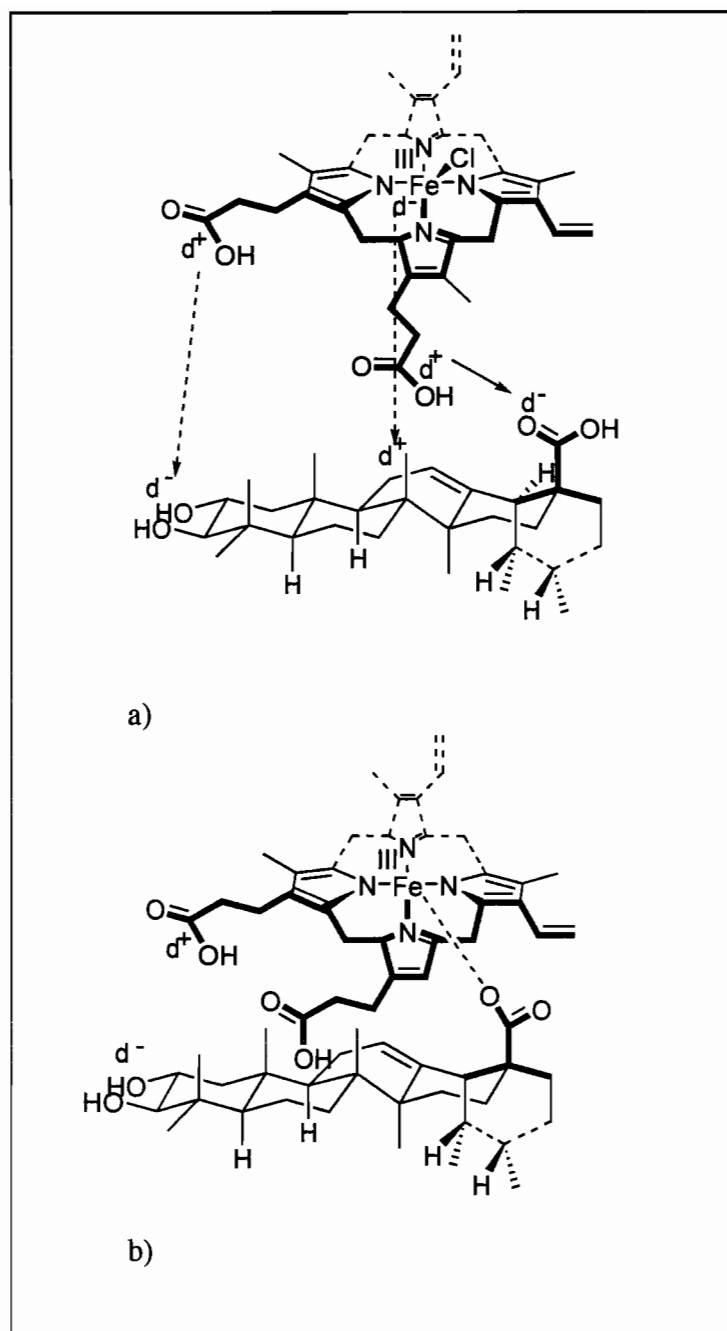


FIGURE # 44. a) Stabilisation du chlorure d'hémine par l'acide corosolique. b) Formation du complexe d'hémine -acide corosolique.

3. Anthraquinone séparée de *Rumex obtusifolius*.

De *Rumex obtusifolius* nous avons séparé une anthraquinone dont la CI_{50} contre FBIT a été très importante (0.071 mg/ml) mais celle-ci n'a pas présenté d'activité contre le parasite *in vitro*.

Si l'on assigne des centres électrostatiques à l'anthraquinone, nous observons qu'elle possède plus d'un centre qui se chargerait négativement (cétones et hydroxyles) alors que les anneaux aromatiques porteraient les pôles positifs. Un comportement similaire s'observe dans les xanthones publiées par Portela et al. Dans celles-ci, les cétones et les hydroxyles voisins forment les zones les plus volumineuses avec un potentiel électrostatique négatif [Portela et al., 2004]. En appliquant cette observation à la déméthylmacrosporine I que nous avons isolée de *R. obtusifolius*, les deux cétones porteraient les pôles négatifs mais celle qui présente un hydroxyle dans la position beta serait d'une taille plus grande. D'un autre côté, le pôle positif se répartit entre les cycles aromatiques. La Figure # 45 présente dans l'incise (a) l'interaction stabilisatrice entre le chlorure d'hémine et la déméthylmacrosporine I alors que l'incise (b) montre le complexe qui se génère moyennant une liaison Fe-O- comme dans le cas de l'hématine.

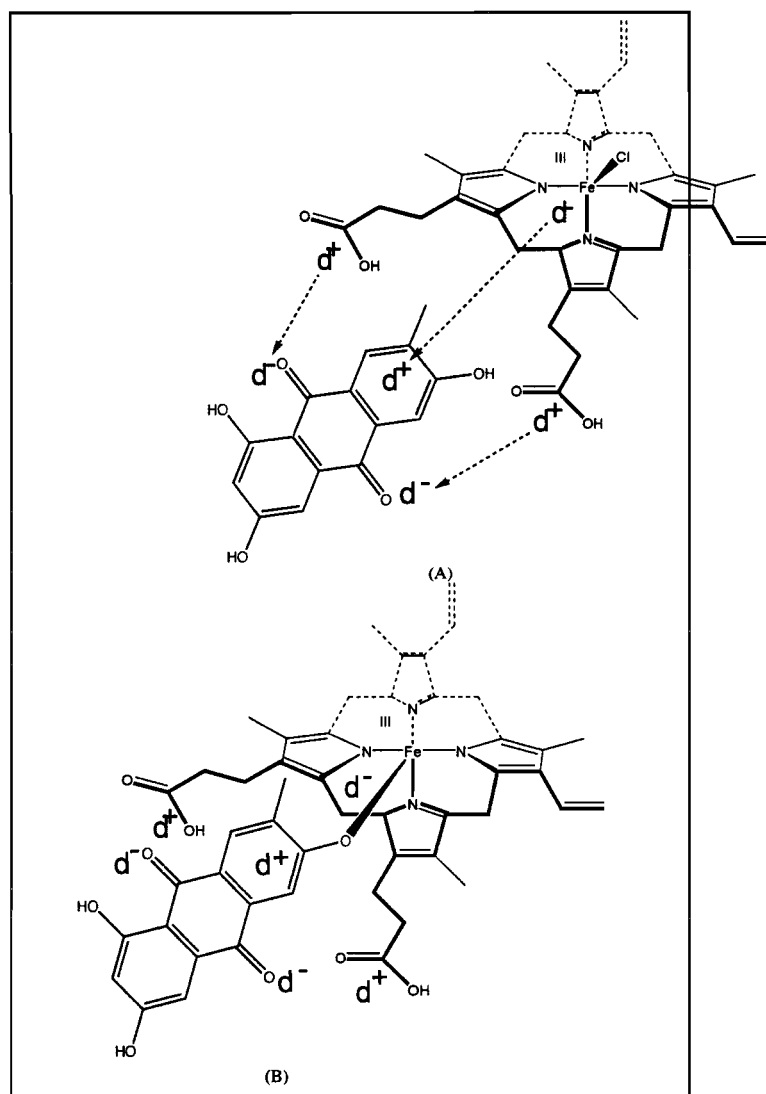


FIGURE # 45. a) Stabilisation du chlorure d'hémine par la déméthylmacrosporine I. b) Formation du complexe d'hémine-déméthylmacrosporine I.

4. Alcaloïdes du type ormosia séparés de *Bowdichia virgiloides*.

De *Bowdichia virgiloides*, deux alcaloïdes, l'ormosanine et la homo-ormosanine ont été identifiés, dont les CI_{50} dans le test FBIT ont été intéressants avec des valeurs de 0.18 y de 0.10 mg/ml; respectivement. Les activités de ces produits contre *Plasmodium falciparum in vitro* et *in vivo* sont également importantes. L'ormosanine présente par exemple un CI_{50} de 5 μ g/ml *in vitro* [Bravo et al., 2002a].

Si l'on assigne des centres électrostatiques à ces alcaloïdes, nous observons qu'ils possèdent plus d'un centre qui se chargerait négativement, localisés sur chaque atome d'azote. D'un autre côté, les cycles des molécules seraient porteurs de charges positives. Nous représentons dans la Figure # 46 l'interaction stabilisatrice entre l'homoormosanine et le chlorure d'hémine. Il est important de noter que dans cette hypothèse, l'union entre l'alcaloïde et l'hème synthétique est du type $-Fe-N^+$. Ce type de liaison chargée, dont l'origine vient de la paire d'électrons libres du l'azote, serait responsable de la forte activité enregistrée pour ce type de molécules.

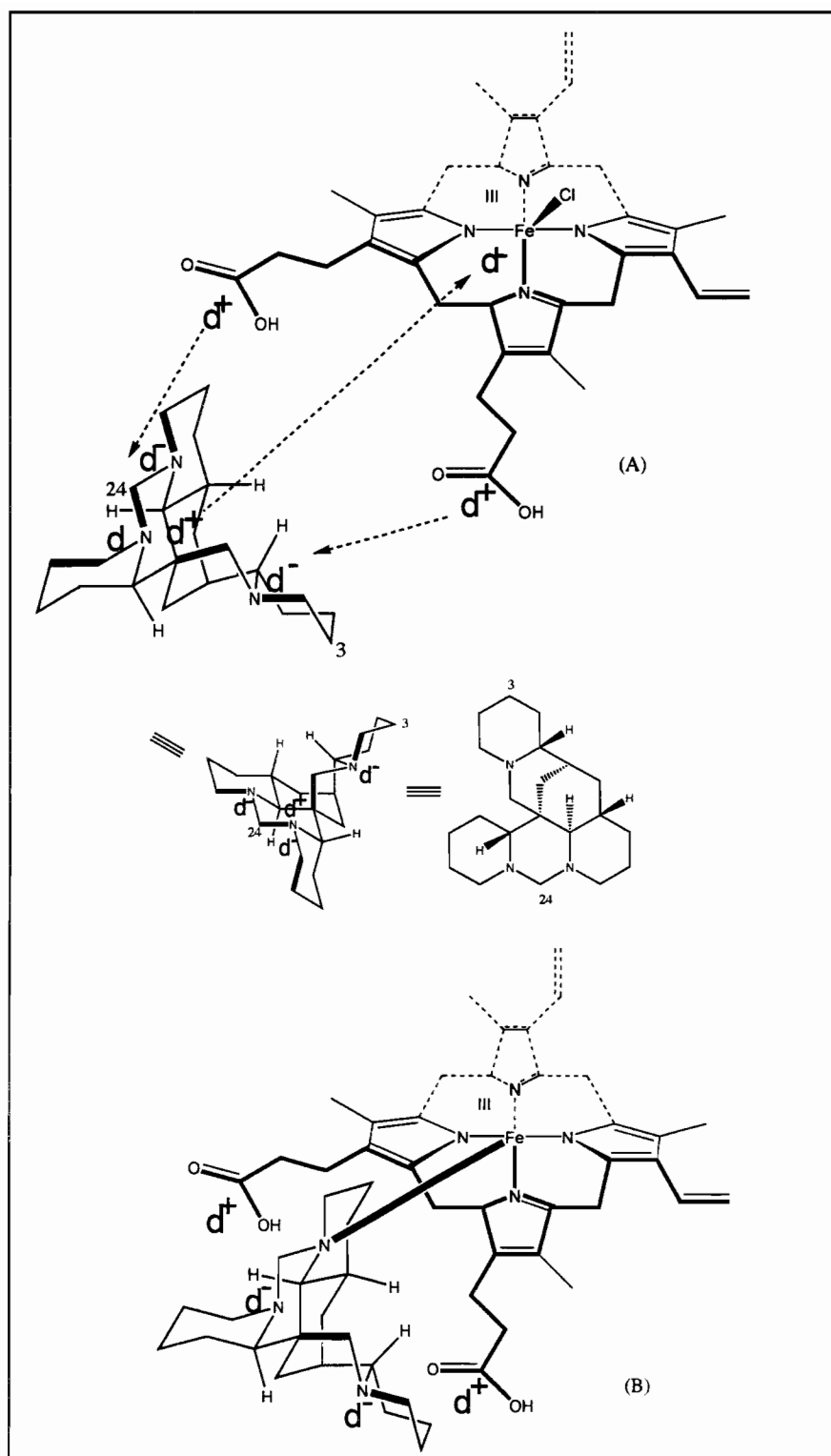


FIGURE # 46. a) Stabilisation du chlorure d'hémine par l'homormosanine. b) Formation du complexe d'hémine- homormosanine.

5. Composés de contrôle

Les composants de contrôle utilisés en FBIT ont été la quinine (produit naturel) et la chloroquine (produit synthétique). La distribution de potentiels pour la chloroquine a été présentée par Portela et al et (2004). Dans cette molécule, les centres négatifs se concentrent sur l'azote quinoléique et sur le chlorure. D'un autre côté, la charge positive se centre sur les cycles aromatiques. Pour le cas de la quinine, on propose un comportement électronique sur la base de la partie (moitié) aromatique proposée par Portela pour plusieurs quinoléines. Dans cette proposition, les pôles négatifs se concentrent sur l'azote aromatique et l'oxygéné du méthoxyle [Portela et al. 2004]. Les Figures # 47 et # 48 présentent les interactions de stabilisation et le complexe formé entre ces alcaloïdes et l'hème synthétique.

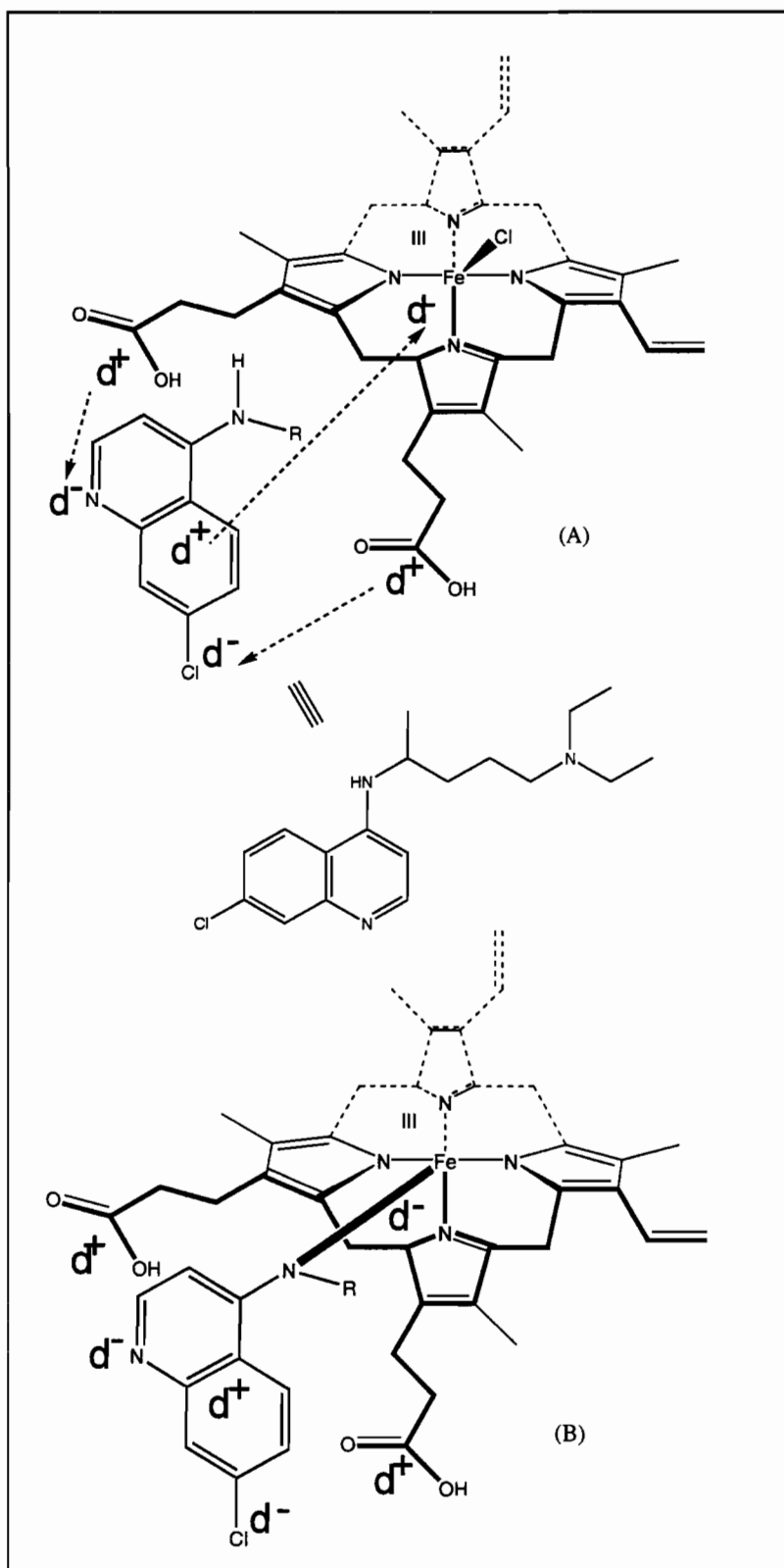


FIGURE # 47. a) Stabilisation du chlorure d'hémine par la chloroquine. b) Formation du complexe d'hémine- chloroquine.

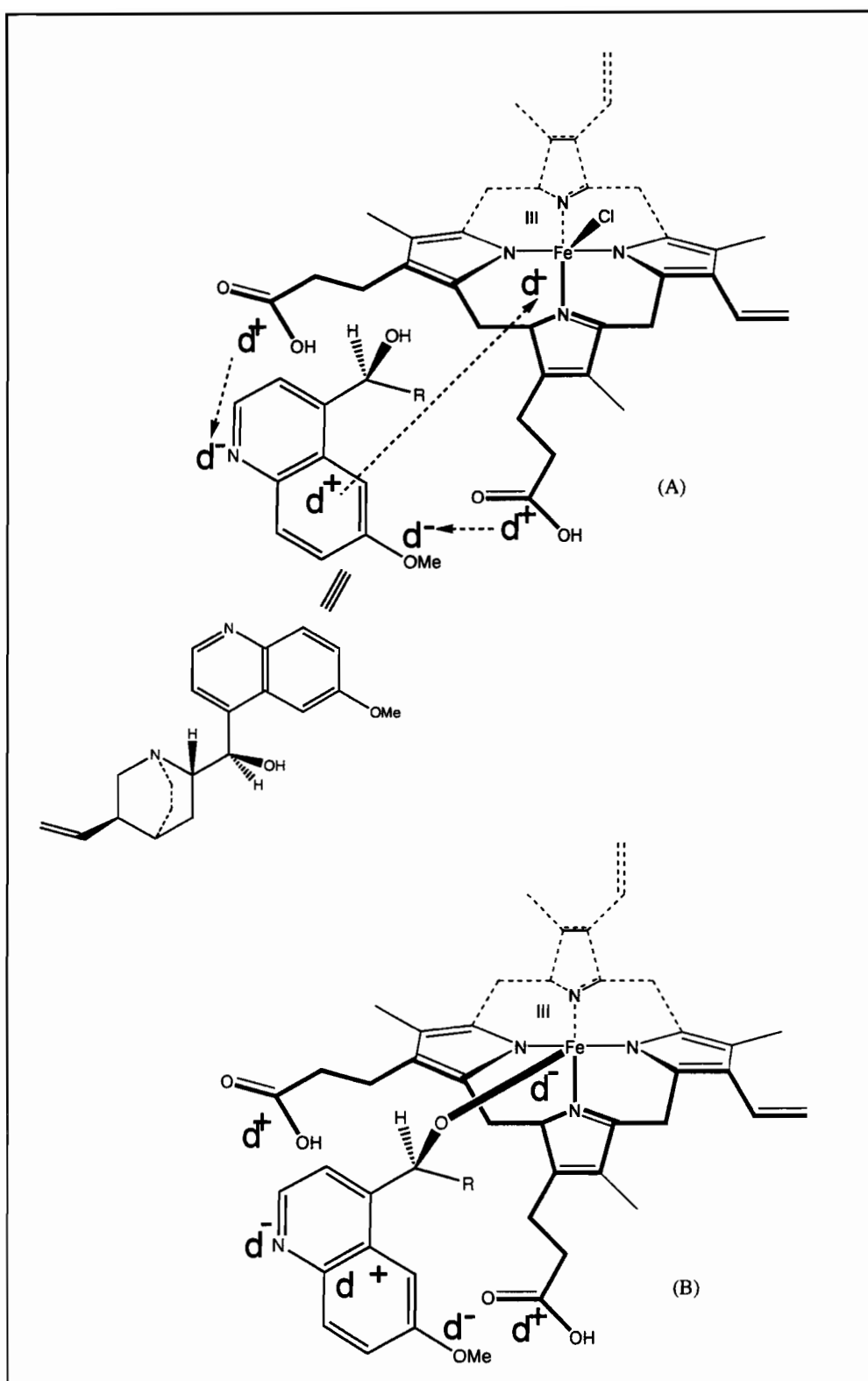


FIGURE # 48. a) Stabilisation du chlorure d'hémine par quinine. b) Formation du complexe d'hémine- quinine.

PARTIE VII

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

1.Plantes de la Vallée de Zongo en Bolivie

A. Collectes et criblage pharmacologique des espèces dans la Vallée de Zongo

Nous avons réalisé 3 voyages de collecte dans la vallée de Zongo, en octobre 2001, en février 2002 et en mai 2002. 63 plantes ont été récoltées suivant trois critères de récolte: le critère chimio-taxonomique, le critère organoleptique et la collecte en fonction de zones écologiques délimitées par les altitudes (parcelles altitudinales). Les 63 plantes correspondent à 32 familles et à 56 espèces différentes. Des 56 espèces différentes, 8 ont été récoltées en suivant le critère chimio-taxonomique, 22 le caractère organoleptique et 26 espèces la collecte par parcelles altitudinales.

Des 8 espèces collectées suivant le critère chimio-taxonomique, 7 sont actives à 2.5 mg/ml sur le test FBIT avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 60 %. Une de ces espèces, *Liabum hastifolium* (*Loranthaceae*) a été active dans chaque type d'essai (75% d'inhibition sur le test FBIT à la concentration de 2.5 mg/ml et 54 % inhibition contre *P. falciparum in vitro* à 10 µg/ml).

Des 22 espèces collectées suivant le critère organoleptique, seulement 8 ont inhibé la biocrystallisation de la FPIX avec un pourcentage d'inhibition égal à 60 %. Parmi ces plantes, il est important de souligner que les fleurs lilas de *Brachyotum microdon* (*Melastomataceae*) montrent la plus forte activité contre *P. falciparum in vitro*

(97 % inh. à 10 μ g/ml). Cependant, les fleurs n'inhibent pas la biocristallisation de la FPIX suggérant que son inhibition utilise un mécanisme de réaction différent de celui du test FBIT. D'autre part, les feuilles de cette plante montrent une importante inhibition dans l'essai FBIT (63% inh. à 2,5 mg/ml) mais aucune activité envers *P. falciparum*.

Finalement, des 26 espèces collectées à différentes altitudes, nous avons trouvé seulement 9 plantes actives contre FBIT et aucune d'entre elles est active contre *P. falciparum*.

Il est important de noter que les espèces qui ont été collectées à différentes époques présentent une variation d'activité dans les essais réalisés. On peut apprécier ce fait surtout avec *Liabum hastifolium* et *Gaiadendron punctatum* dont les extraits ont été plus actifs à l'occasion de la collecte de mai qui correspond au début de l'hiver (pluies peu abondantes et températures basses). D'un autre côté, les résultats obtenus sur les extraits de *Brachyotum microdon* n'ont pas varié beaucoup en fonction des 3 collectes. La plupart des espèces actives proviennent de la zone altitudinal appelée "Yungas" (800- 2800 m) zone plus chaude et plus humide.

B. Travaux sur *Brachyotum microdon* (Melastomataceae).

Des feuilles de *Brachyotum microdon*, deux groupes de molécules actives de polarité différente ont été séparés et identifiés.

De la fraction la moins polaire on a obtenu un mélange d'alcools gras qui ont été caractérisés comme $C_{34}H_{70}O$, $C_{32}H_{66}O$, $C_{30}H_{62}O$ et $C_{28}H_{58}O$. De la partie polaire de la plante, nous avons purifié et caractérisé le β -sitostérol qui est partiellement responsable de l'activité sur la polymérisation de l'hème avec une CI_{50} de 0.17 mg/ml. Nous avons également caractérisé trois triterpènes acides présentant des activités sur la

métabolisation de l'hémoglobine et sur la schizogonie érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*: l'acide oléanolique (CI_{50} = 0.61 mg/ml en FBIT et CI_{50} = 96 μ g/ml contre *P. falciparum*), l'acide ursolique (CI_{50} = 1.57 mg/ml en FBIT et CI_{50} = 59 μ g/ml contre *P. falciparum*) et l'acide corosolique (CI_{50} = 0.24 mg/ml en FBIT et CI_{50} = 100 μ g/ml contre *P. falciparum*). Tous les triterpènes séparés de *B. microdon* ont été décrits moyennant des techniques spectroscopiques de RMN à 1 et 2 dimensions et par deux types de techniques de spectrométrie de masse.

Cette recherche a abouti à la description pour la première fois des acides oléanolique, ursolique et corosolique dans *Brachyotum microdon*. Ces acides terpéniques sont des inhibiteurs originaux de la biocristallisation de la ferriprotoporphyrine IX (FPIX).

C. Travaux sur *Rumex obtusifolius* (Polygonaceae)

Rumex obtusifolius a été largement étudié tant chimiquement que biologiquement, parce que c'est une plante utilisée dans la médecine traditionnelle de plusieurs pays sud américains.

De l'extrait éthanolique des feuilles de *Rumex obtusifolius* (60% inh. a 2.5 mg/ml en FBIT), on a purifié grâce à une séparation bio-guidée une anthraquinone, la déméthylmacroporine I (CI_{50} = 0.071 mg/ml). Le résultat du test FBIT de cette anthraquinone est proche de celui enregistré pour la quinine (0.03 mg/ml).

2. Plantes amazoniennes

A. Travaux sur *Gustavia augusta* (Lecythidaceae)

L'extrait chloroformique des graines de *Gustavia augusta* actif sur la biocristallisation de l'hème a permis d'isoler un alcool gras actif, $C_{37}H_{72}O$ (CI_{50} = 0.14 mg/ml en FBIT).

B. Travaux sur *Bowdichia virgilioides* (Leguminosae)

L'étude d'élucidation structurale de deux alcaloïdes séparés de *Bowdichia virgilioides* a permis de leur assigner les structures d'homormosanine (CI_{50} = 0.18 mg/ml en FBIT) et ormosanine (CI_{50} = 0.10 mg/ml en FBIT).

3. Relation structure- activité

Nous proposons un possible mécanisme d'interférence des molécules isolées des plantes boliviennes inhibitrices de la biocristallisation de l'hème basé sur les travaux de Portela et ses collaborateurs [Portela et al., 2004]. Les centres électroniques du composé inhibiteur interagissent avec les pôles opposés trouvés dans l'hématine. Dépendant du type de molécule, les profils électrostatiques complémentaires varient en donnant naissance à différents types d'unions composant- hème synthétique.

Dans le cas des acides triterpéniques, les pôles négatifs se trouveraient portés par les acides carboxyliques alors que le pôle positif s'ajouterait au potentiel nul généré par la double liaison. Le complexe: composant- hème est créé moyennant la mise en place

d'une liaison Fe-OCO. Dans le cas de l'anthraquinone, les pôles négatifs se trouveraient sur les carbonyles laissant le potentiel positif localisé sur les cycles aromatiques. La liaison qui se forme entre l'anthraquinone et l'hème est du type Fe-O.

Dans le cas des alcaloïdes de type ormosia, les pôles négatifs se trouveraient sur les azotes laissant le potentiel positif se localiser sur les cycles de la molécule. La liaison qui se forme entre l'alcaloïde et le hème est du type Fe-N- pour l'ormosanine et Fe-N⁺- pour la homoormosanine.

Comme on peut l'apprécier dans les paragraphes précédents, toutes les molécules présentent une interaction stabilisatrice avec le chlorure d'hémine et forment un complexe avec lui. La différence entre les valeurs de CI_{50} observées parmi ces molécules pourrait être expliquée sur la base de trois facteurs:

- Le comportement électrostatique dans la molécule active. Le type d'atome ou groupe fonctionnel qui engendre les pôles chargés et la taille de ces derniers pourraient être mis en relation avec la stabilisation et la viabilité de la formation de la liaison molécule-hème.
- La distance entre les pôles négatifs dans la molécule active. Cette séparation affecterait l'interaction stabilisatrice et son pouvoir inhibiteur. Celle-ci diminuerait si ses centres négatifs se trouvent plus loin ou plus près de ceux reportés pour la chloroquine.
- Le type de liaison qui unit la molécule avec le chlorure d'hémine.

Le mécanisme d'inhibition de la FPIX est encore discuté, cependant avec ce qui a été exposé antérieurement et en tenant des données obtenues par Portela, nous pensons que les facteurs électrostatiques plus que les facteurs stériques contrôleraient le mécanisme d'inhibition de la FPIX. Les travaux de Portela se basent sur des calculs DFP de potentiels électroniques des inhibiteurs et de la FPIX. Ces mêmes calculs pourraient être réalisés sur les molécules présentées dans ce travail pour corroborer si des comportements électroniques différents peuvent moduler l'inhibition de la métabolisation de l'hème chez le parasite.

PARTIE VIII

DONNEES EXPERIMENTALES

1. Méthodologie de travail dans la zone d'étude

A. Zone d'étude: la vallée de Zongo

Pour le travail de recherche, nous avons choisi une zone d'étude que respecte trois critères. La zone doit avoir une grande biodiversité végétale, elle doit être proche du laboratoire pour assurer un suivi aisé des nouvelles récoltes et elle doit être peu étudiée. Si on part de la ville de La Paz où est localisé notre laboratoire, située dans la zone occidentale de la Bolivie, on a trois zones possibles d'étude. Ces zones sont le haut plateau andin, les Yungas et la vallée de Zongo. La région des hauts plateaux a été éliminée parce qu'il y a beaucoup d'études et une faible biodiversité, la zone des Yungas a été écartée en raison des problèmes d'accessibilité (situation politique). La dernière zone d'étude est la vallée de Zongo qui est une vallée haute, humide et tropicale localisée au nord de la ville de La Paz. Cette vallée suit bien les critères choisis. Elle est très proche et accessible, on peut aller collecter des plantes en une journée. C'est une zone de biodiversité généreuse; il y a différents étages altitudinaux avec une importante diversité florale [Greenwood et al., 2002]. Dans cette région environ 109 familles et 518 espèces différentes ont été décrites [Solomon, 1981-1988]. Finalement, la vallée de Zongo a été peu étudiée du point de vue phytochimique et biologique.

B. Critères de collecte.

Parmi les différents critères de collecte des plantes, on en a choisi trois. Ces critères sont le critère chimio-taxonomique, l'organo-leptique et la collecte par parcelles altitudinales. Dans le critère chimio-taxonomique, 12 familles et 23 espèces actives contre la malaria en Amérique latine ont été rapportées. La Figure # 49 présente certaines familles et espèces représentatives. Dans les familles présentées, on peut citer différents types de molécules actives. Par exemple, en ce qui concerne la famille de *Simaroubaceae*, des terpénoides du type de quassinoides ont été isolés. Des alcaloïdes de type lycorine ont été reportés de la famille des *Amaryllidaceae*. De la famille *Meliaceae*, différents types de limonoides ont été isolés. La famille *Compositae* a également présenté plusieurs types de terpénoides actifs par exemple la série de neurolénines. Pour terminer cette liste d'exemples, on trouve des publications des alcaloïdes du type quinoléique des *Rubiaceae*. La Figure # 50 présente certains exemples de composés antipaludiques isolés d'espèces américaines [Deharo et al., 2000].

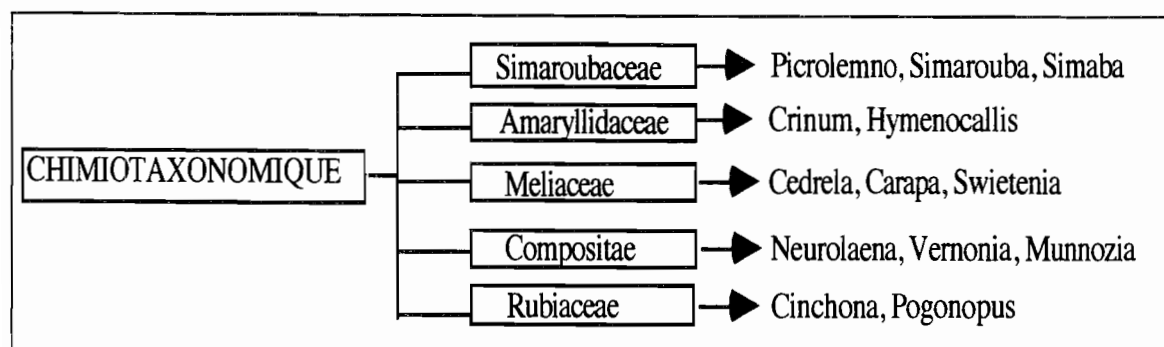


FIGURE # 49. Critère chimio-taxonomique. Exemples de familles et espèces actives contre le paludisme en Amérique.

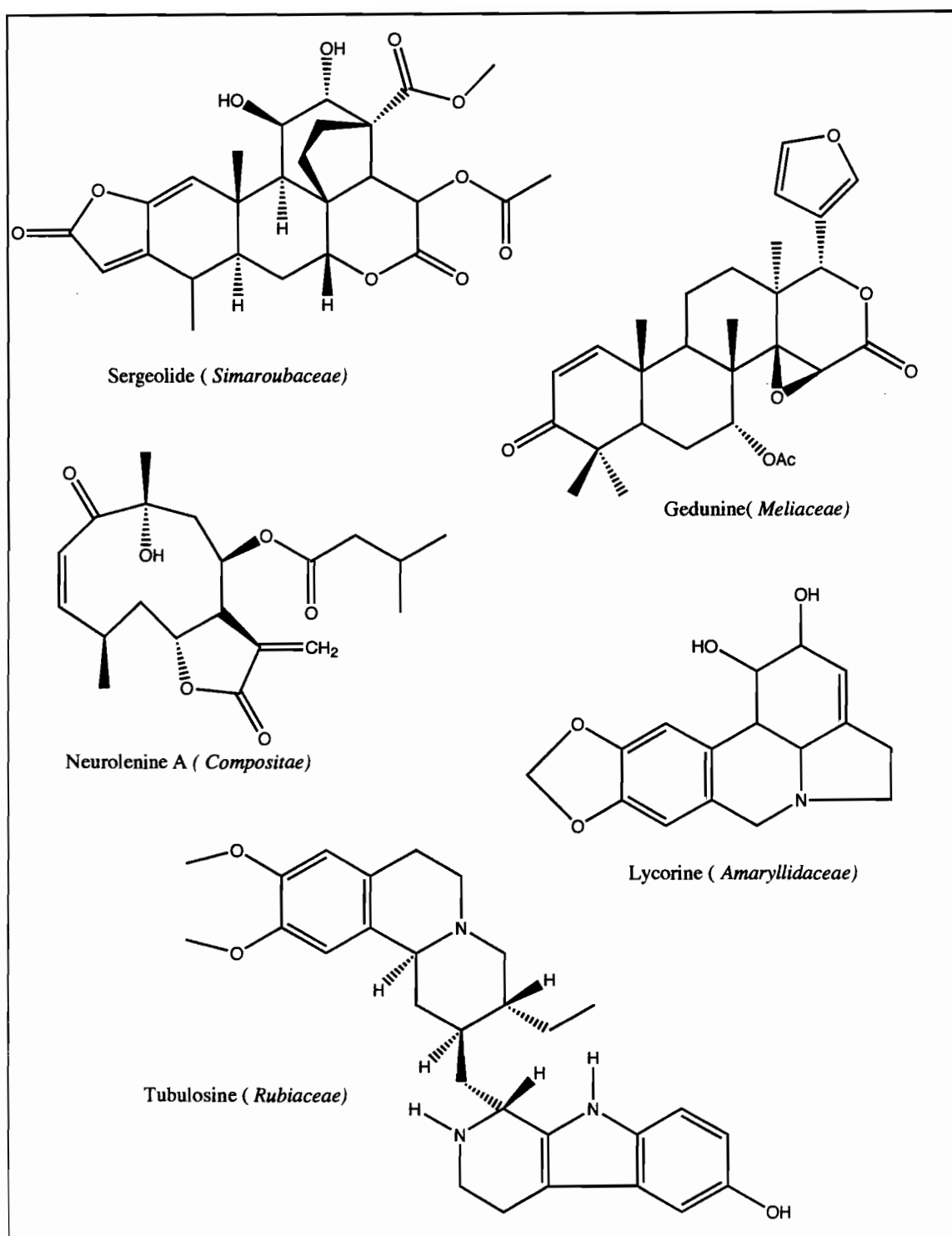


FIGURE # 50. Composés antipaludiques isolés d'espèces américaines.

Le second critère que nous avons utilisé pour les collectes est le critère organoleptique. Nous avons choisi ce critère parce que en 1891, Guttman et Ehrlich ont rapporté l'utilisation du bleu de méthylène (30) pour soigner des malades du paludisme. À partir des résultats précédents, Vennerstrom a étudié l'activité de ce dérivé de thiazine contre *Plasmodium falciparum in vitro* [Vennerstrom et al., 1995]. Ce colorant est plus actif que la chloroquine (33) (CI_{50} = 3.58 et 3.99 nM contre les souches D6 et W2).

Le bleu de méthylène a été testé sur le test FBIT et il a donné un CI_{50} de 38 μ M. [Deharo et al., 2002]. Comme ce colorant présente une intéressante activité à la fois antiparasitaire et d'inhibition de la biocrystallisation de l'hème, on propose de tester avec le FBIT des plantes qui possèdent des organes colorés pour voir si les pigments végétaux pourraient avoir une interaction avec la biocrystallisation de la FPIX. La Figure # 51 présente certaines espèces colorées présentes dans la vallée de Zongo.

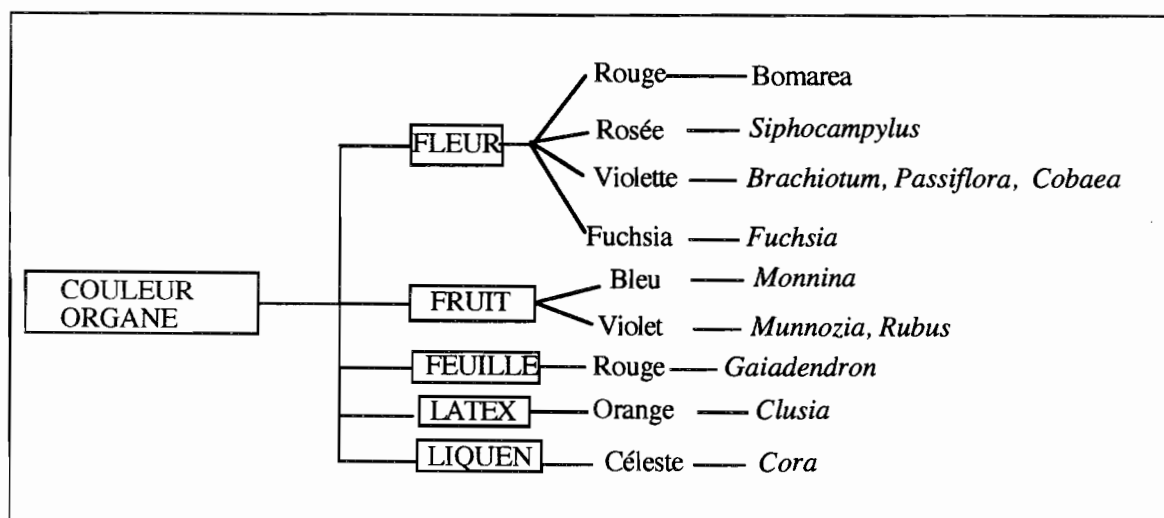


FIGURE # 51. Critère Organoleptique. Exemples d'espèces colorées présentes dans la Vallée de Zongo.

Le troisième critère est la collecte par parcelles altitudinales. La grande variété altitudinale de la vallée du Zongo est accompagnée d'une grande variété climatique, écologique et par conséquent d'une grande variété taxonomique. Ces étages sont l'étage Nival à partir de 4800m d'altitude, l'étage de la Prairie haute andine entre 4200-4800m, l'étage du Páramo yungueño entre 3600-4200m, l'étage du Sourcil de montagne des Yungas entre 2800-3600m et le dernier étage est l'étage Yungas entre 400-2800m. [Ortuño, 2000; Baudoin, 1991]. Chaque niveau a une flore déterminée, mais il est possible de trouver les mêmes espèces à différents niveaux. La Figure # 52 présente des espèces représentatives des différents étages altitudinaux de la Vallée de Zongo.

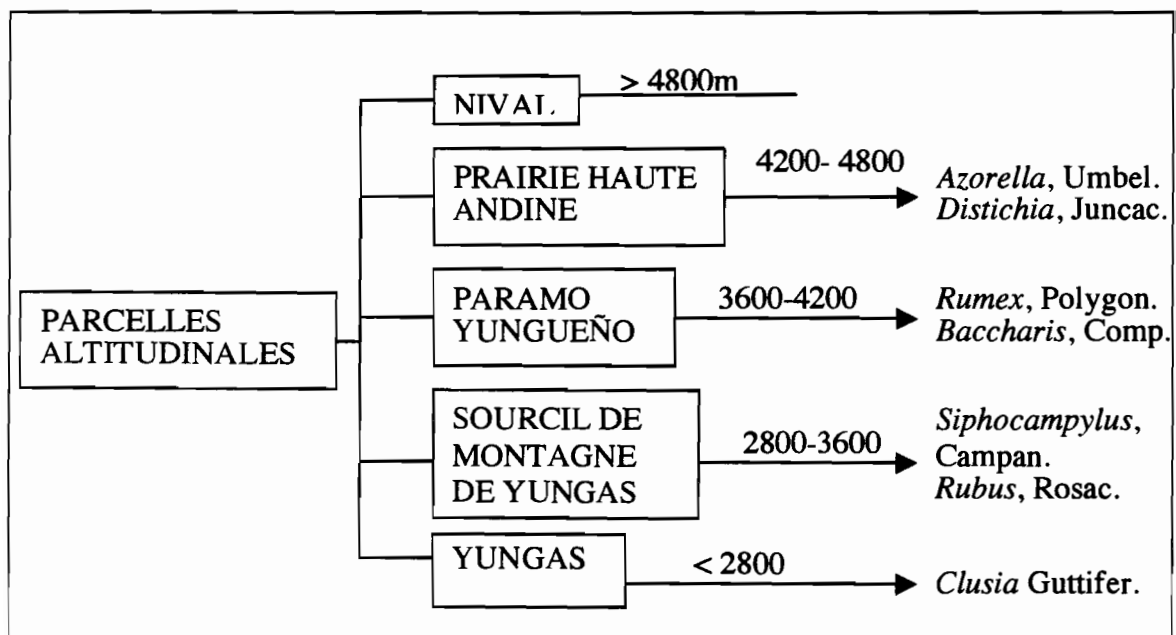


FIGURE # 52. Critère de parcelles altitudinales. Exemples d'espèces trouvées dans les étages altitudinaux de la Vallée de Zongo.

C. Essais biologiques sur *Plasmodium falciparum* et FBIT

1. Test d'inhibition de la biocristallisation de la ferriprotoporphyrine IX (FBIT)

Principe

Plasmodium dans sa phase érythrocytaire consomme les chaînes d'acides aminés de la globine et se débarrasse des groupes héminiques de l'hémoglobine sous une forme appelée hémozoïne qui est semblable spectrophotométriquement à la β -hématine, dimère de ferri-protoporphyrine IX (FPIX). Ce phénomène est indispensable à la croissance du parasite. En effet, les acides aminés servent à la construction de ses propres protéines et la détoxification de l'hème, sous la forme d'un polymère, le protège de l'action oxydante des groupes porphyriques.

Afin de quantifier sa formation, ce précipité est isolé par lavage et centrifugation, puis dissout dans une solution de soude dont on mesure la densité optique à 405 nm. On peut ainsi tester l'activité inhibitrice d'une molécule ou d'un extrait en comparant la quantité de β -hématine formée en présence (test) et en absence (blanc) de l'inhibiteur potentiel. On détermine un pourcentage d'inhibition de cette réaction de biocristallisation à une dose donnée par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times [(O.D.\text{control} - O.D.\text{drug}) / (O.D.\text{control})].$$

La synthèse d'une hémozoïne-like dans le laboratoire se fait dans des conditions opérationnelles relativement faciles à partir du chlorure d'hémine. De fait, il est facile d'évaluer simplement l'activité de drogues sur la formation d'hémozoïne. Les produits

bloquant la biocristallisation sont potentiellement antipaludiques. Il n'est pas nécessaire de travailler en conditions stériles et le matériel est facilement accessible.

L'essai de FBIT a permis d'augmenter le nombre d'extraits à essayer pour augmenter la détection de substances potentiellement antipaludiques.

Méthode

Les extraits éthanoliques des plantes recueillies et les fractions obtenues moyennant un travail de séparation phytochimique ont été dissous en DMSO. Les fractions apolaires ont été dissoutes dans une solution de CH₂Cl₂: DMSO (1/16). La capacité des extraits et des fractions à inhiber la biocristallisation de la ferriprotoporphyrine IX (FPIX) a été obtenue suivant les protocoles préalablement reportés par Baelmans et Deharo [Baelmans et al. 2000; Deharo et al. 2002]. Un mélange contenant 50 µl de la solution de l'extrait ou fraction (2.5 mg/ml en concentration finale dans le puit) ou 50 µl de dissolvant (DMSO ou CH₂Cl₂: DMSO (1/16) pour contrôle), 50 µl de 0.5 mg/ml de chlorure d'hémine (SIGMA H 5533) dissoute en DMSO et 100 µl de 0.5 M d'acétate de sodium buffer pH 4.4 ont été incubé dans une plaque de microtitration plane de 96 puits à 37°C pour 20 heures. Les solutions doivent être ajoutés de la façon suivante: premièrement le chlorure d'hémine, deuxièmement le tampon et enfin le solvant témoin ou l'extrait. Après le chauffage, la plaque est centrifugée à 1600 g pendant 5 min. Le surnageant est éliminé en inversant la plaque et en la secouant vigoureusement deux fois. Le précipité est lavé à nouveau avec 200 µl de DMSO pour éliminer la FPIX qui n'a pas réagi. La plaque est centrifugée et le surnageant de nouveau éliminé comme indiqué auparavant. Le précipité de β-haematine est dissous dans 150 µl de NaOH 0.1 M pour la quantification spectroscopique à 405 nm avec un lecteur micro-ELISA (Titertek Multiskan MCC/340). Les données sont exprimées en pourcentage d'inhibition de la biocristallisation de FPIX. Chaque extrait

ou fraction est testé en triplicate. L'hydrochlorure de Quinine (CI_{50} : 0.03 mg/ml) a été utilisée comme contrôle positif d'origine naturelle.

2. Test *in vitro* d'inhibition de la croissance de la phase érythrocytaire de *Plasmodium falciparum*

Principe

Ce test a été développé à partir des travaux de Trager et Jensen [Trager et Jensen, 1976] et celui-ci se caractérise pour être une méthode visuelle qui utilise un colorant. Le Giemsa est un colorant composé par un colorant acide (bleu d'éosinate) et par un colorant basique (violet de méthylène) qui précipite dans l'eau. Le précipité obtenu est le colorant neutre, insoluble dans l'eau mais soluble dans le méthanol. Ce colorant neutre n'est pas actif dans la solution alcoolique mais lorsqu'il est en contact avec l'eau. Cette activité s'observe grâce à la précipitation du colorant neutre. Les protozoaires dissocient le colorant neutre en teignant de rouge son noyau (ADN) et en bleu son cytoplasme. Le test consiste à incuber 48 h une culture de *P. falciparum* (schizogonie érythrocytaire) en présence d'inhibiteurs potentiels et à mesurer un pourcentage d'inhibition de croissance du parasite par rapport à un témoin sans drogue [Deharo et al., 2000].

Méthode

Des cultures de souches de F 32 - Tazmania (chloroquino sensible) de *Plasmodium falciparum* ont été maintenues suivant la méthode de Trager et Jansen [Trager et Jensen, 1976] dans le milieu RPMI 1640, riche en glucose et avec un ajout de 10% de sérum humain à 37°C. Le solvant des extraits ou composés testés est le DMSO.

La concentration finale de DMSO n'a jamais été supérieure à 0.1%. Cent cinquante microlitres du milieu de culture avec l'extrait et la suspension de globules rouges infectés (0+ groupe, 5% hématocrite, 1% parasitémie), sont distribués en plaques de microtitration de 96- puits. Tous les essais sont réalisés en triplicate. Après 24 heures d'incubation à 37°C en présence de CO₂ (Candle Jar), le milieu est remplacé par un milieu frais contenant l'extrait ou fraction à tester et l'incubation est prolongée durant 48 heures additionnelles. Le troisième jour d'essai, un aliquot est prélevé dans chaque puits, un frottis est réalisé et la parasitémie est comptée. Le pourcentage d'inhibition de la parasitémie de chaque extrait est calculé en relation avec le contrôle. On détermine graphiquement les valeurs de CI₅₀. La Chloroquine est utilisée en tant que contrôle (CI₅₀: 6 ng/ml).

La Figure # 53 présente la comparaison entre les essais de FBIT et de *Plasmodium falciparum*.

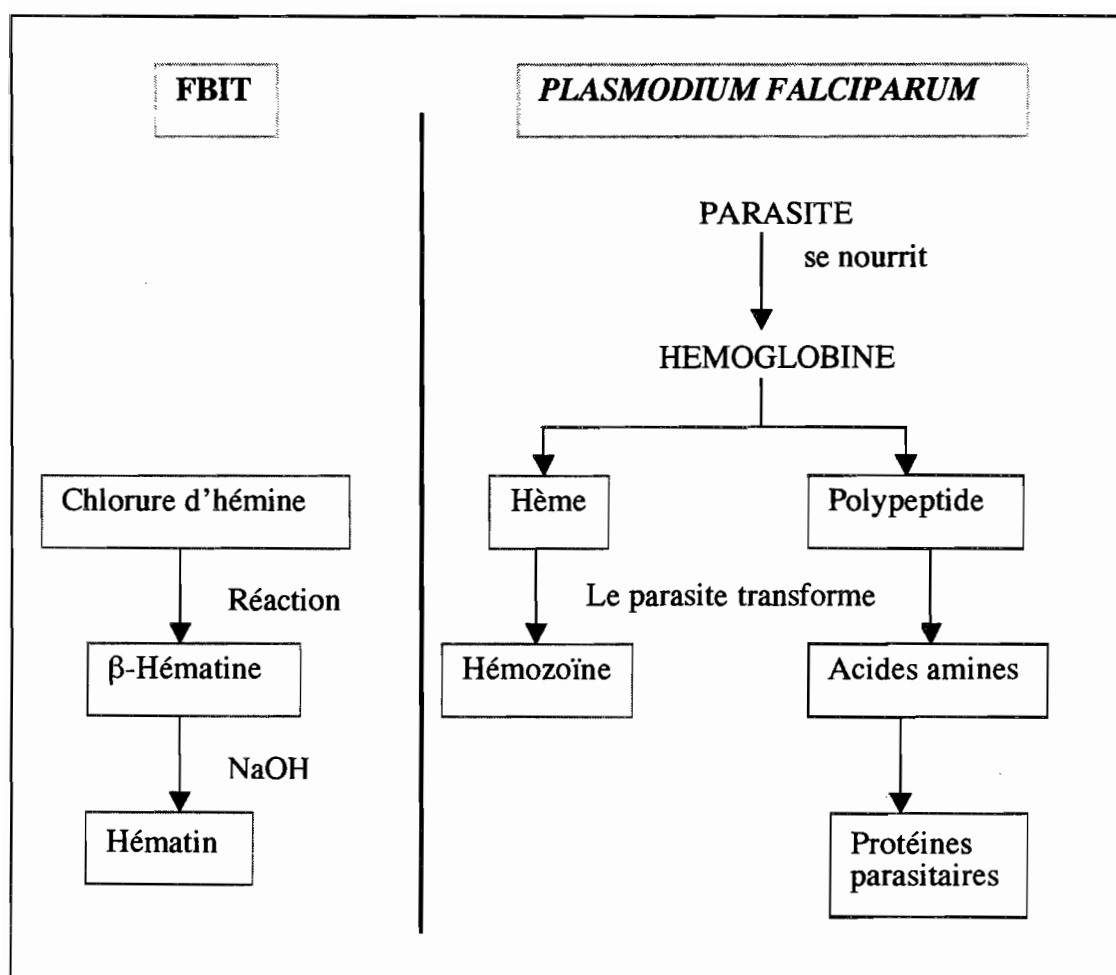


FIGURE # 53. Comparaison entre les essais FBIT et *Plasmodium falciparum*

2. Plantes de la Vallée de Zongo en Bolivie

A. Collectes et criblage pharmacologique des espèces dans la Vallée de Zongo

Nous avons réalisé 3 voyages de collecte dans la vallée de Zongo, lesquels ont été dénommés Collecte I à Collecte III. La première collecte a été effectuée le 29 octobre 2001. À l'occasion de cette expédition, nous avons ramassé 24 espèces végétales. Le second voyage s'effectua le 28 février 2002 et l'on a obtenu 22 échantillons. La dernière collecte a été réalisée le 29 mai de la même année et 19 espèces supplémentaires ont été collectées. Un total de 63 plantes a été récolté suivant trois critères de récolte: le critère chimio-taxonomique, le critère organoleptique et la collecte en fonction de zones écologiques délimitées par les altitudes (parcelles altitudinales). Les 63 plantes correspondent à 32 familles et à 56 espèces différentes. Plusieurs espèces ont été récoltées plus d'une fois à des dates et dans des lieux différents.

Dans les pages suivantes, nous présentons les espèces collectées sous forme de fiche comportant la classification, la date de collecte, le critère de collecte, le numéro d'échantillons d'herbier, le lieu de collecte, l'altitude de la collecte, l'usage traditionnel et l'écosystème s'y rapportant. Les espèces sont classées par ordre alphabétique de famille, genre et espèces [Garcia Barriga, 1975; Cronquist, 1981; Heywood, 1978; Dimitri, 1980, Polhill et Raven, 1981 et Girault, 1984].

Alstroemeriaceae

(Amaryllidaceae)

Environ 90 classes et 1000 espèces distribuées sur les deux hémisphères du globe terrestre.

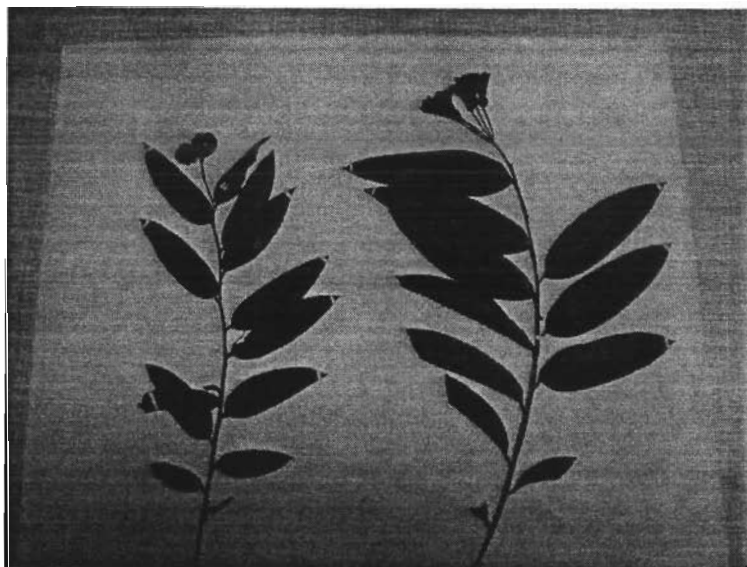
Genre collecté: *Bomarea*

Espèces collectées: *Bomarea distichophylla* (Ruiz & Pav.)
Baker

Bomarea formosissima Ruiz & Pav.

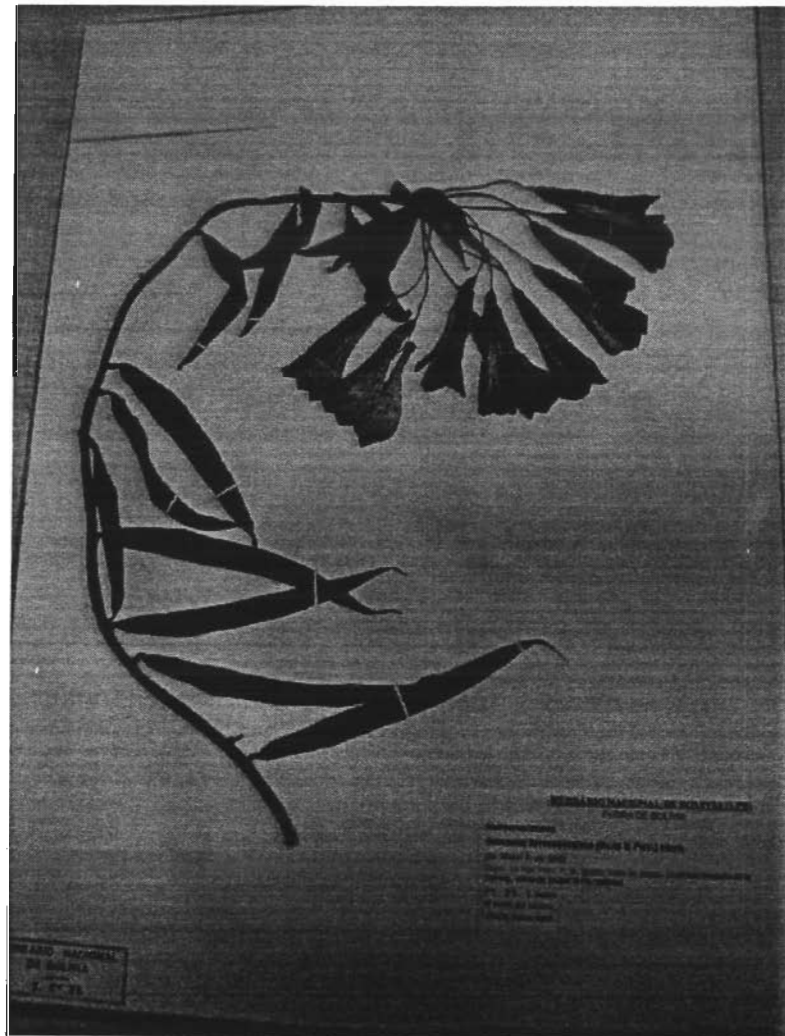
Bomarea distichophylla (Ruiz & Pav.) Baker

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.
Critère de collecte: Organoleptique, fleur de couleur rouge.
N° d'herbier: RM2999.
Lieu de collecte: 19 - 20 Km. de la digue de Zongo avant de traverser la rivière (antenne).
Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600 msnm).
Usage traditionnel: Fruits: contre les épistaxis. Bulbes: abortifs (*Bomarea* sp.)



***Bomarea formosissima* Ruiz & Pav.**

Date de collecte:	28 février 2002. Collecte II.
Critère de collecte:	Organoleptique, fleur de couleur rouge.
N° d'herbier:	RM2995.
Lieu de collecte:	19- 20 Km. de la digue de Zongo, avant de traverser la rivière (antenne).
Ecosystème et altitude:	Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).
Usage traditionnel:	Fruits: contre les épistaxis. Bulbes: sont abortifs (<i>Bomarea</i> sp).



Araliaceae

Environ 60 classes et 700 espèces dans leur majorité tropicales.

Genre collecté: *Oreopanax*

Espèce collectée: *Oreopanax sp.*

Oreopanax sp.

date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.

Critère de collecte: Altitudinal.

N° Voucher: SI-20

Lieu de collecte: 19 Km. de la digue de Zongo.

Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).

Usage traditionnel: Feuilles: contre les rhumatismes articulaires et les dislocations osseuses.



copyright Barry Hammel

Asclepiadaceae

Environ 230 classes et plus de 1800 espèces distribuées principalement dans les régions chaudes de la planète. Quelques-unes d'entre elles sont décoratives, médicinales ou comestibles.

Genre collecté: *Cynanchum*

Espèce collectée: *Cynanchum sp.*

Cynanchum sp.

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.

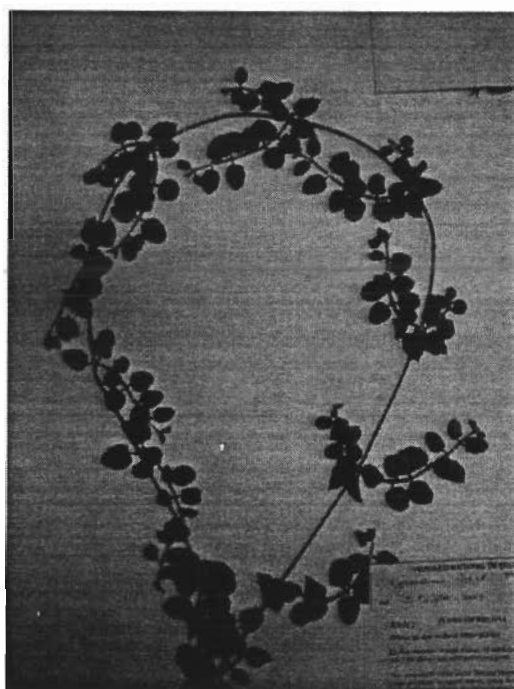
Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: RM3001

Lieu de collecte: 23 Km. de la digue de Zongo. Barrage hydro-électrique de Cuticucho.

Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).

Usage traditionnel: Feuilles, tiges et fleurs: aphrodisiaques. Feuilles et tiges: vomitifs. (*C. formosum* N.E. B.R.)



Berberidaceae

Environ 14 genres et plus de 200 espèces distribuées dans les régions de climat sec.

Genre collecté: *Berberis*

Espèce collectée: *Berberis aff. paucidentata* Rusby.

Berberis aff. paucidentata Rusby

Date de collecte: 29 mai du 2002. Collecte III.

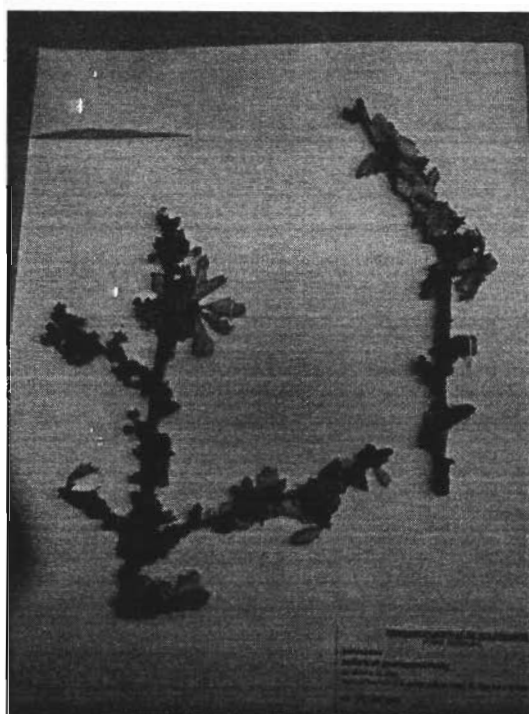
Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: RM3016

Lieu de collecte: 15.1 Km. de la digue de Zongo. Avant du barrage hydroélectrique de Botijlaja.

Ecosystème et altitude: Paramo Yungeño (3600- 4200 msnm).

Usage traditionnel: Feuilles: contre la dysenterie et les angines. Écorce de la tige: fébrifuge. Racine: laxatif. Fruits: contre la fièvre typhoïde. (*Berberis* sp.)



Campanulaceae

Plus de 70 genres et environ 2000 espèces qui prédominent dans les régions tropicales. Quelques-unes se cultivent pour la décoration.

Genre collecté: *Centropogon*

Espèces collectées: *Centropogon gloriosus* (Britton) Zahlbr.

Genre collecté: *Siphocampylus*

Espèces collectées: *Siphocampylus cf. bilabiatus* Zahlbr.

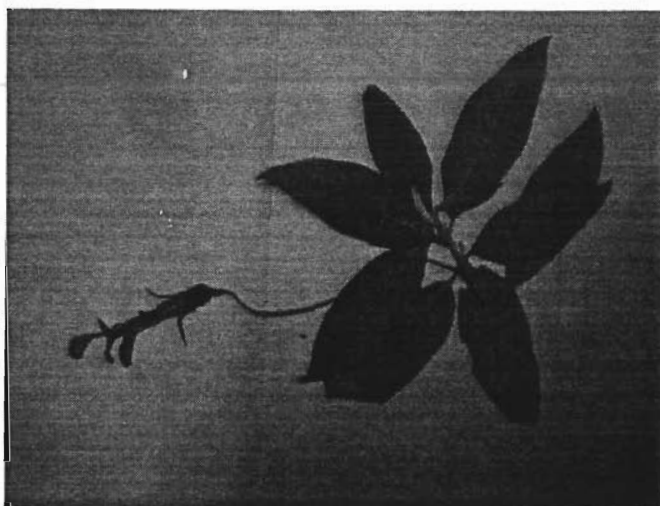
Siphocampylus dubius Zahlbr.

Siphocampylus tupaiformis Zahlbr.

Siphocampylus sp.

Centropogon gloriosus (Britton) Zahlbr.

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Organoleptique, fleur de couleur rouge.
N° d'herbier: SI-4.
Lieu de collecte: 30 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel: Feuilles et fleurs: contre les parasites intestinaux et les palpitations cardiaques (*Centropogon sp.*)



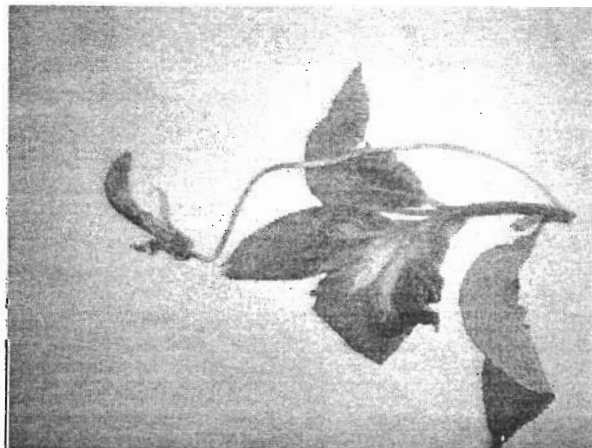
***Siphocampylus cf. bilabiatus* Zahlbr.**

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Organoleptique, fleur de couleur rouge.
N° d'herbier: SI-2.
Lieu de collecte: 37 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel: Feuilles et fleurs: pour les blessures infectées.
Tiges: contre les accès nerveux (*Siphocampylus* sp.)



***Siphocampylus dubius* Zahlbr.**

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Organoleptique, fleur de couleur rose.
N° d'herbier: SI-15.
Lieu de collecte: 32 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel: Feuilles et fleurs: pour les blessures infectées.
Tiges: contre les accès nerveux (*Siphocampylus* sp.)



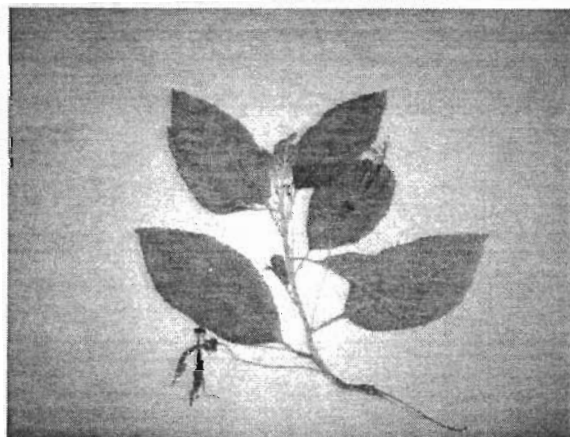
***Siphocampylus tupaeformis* Zahlbr.**

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.
Critère de collecte: Organoleptique, fleur de couleur rose.
N° d'herbier: RM2993.
Lieu de collecte: 16 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).
Usage traditionnel: Feuilles: antiseptiques. Feuilles et fleurs: contre les douleurs cardiaques, les palpitations et pour les blessures infectées. Tiges: contre les accès nerveux.



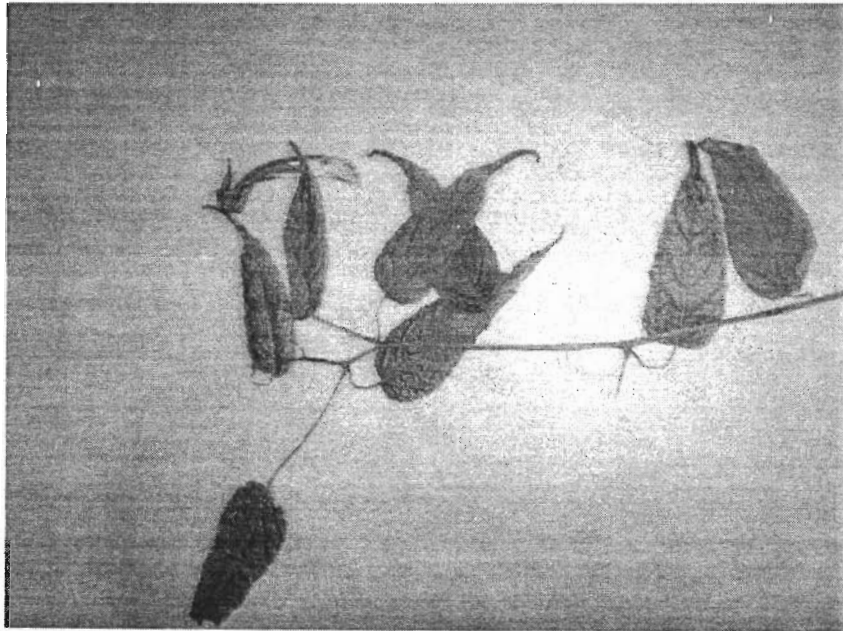
***Siphocampylus* sp.**

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Organoleptique, fleur de couleur rose.
N° d'herbier: SI-1.
Lieu de collecte: 30 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel: Feuilles et fleurs: pour les blessures infectées. Tiges: contre les accès nerveux.



Siphocampylus sp.

Date de collecte:	29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte:	Organoleptique, fleur de couleur rose.
N° d'herbier:	SI-8.
Lieu de collecte:	24 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude:	Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel:	Feuilles et fleurs: pour les blessures infectées. Tiges: contre les accès nerveux.



Capparidaceae

Environ 40 genres et 700 espèces distribuées dans les régions chaudes. Les boutons de fleurs de *Capparis spinosa* constituent les câpres.

Genre collecté: *Cleome*

Espèce collectée: *Cleome lechleri* Eichl.

Cleome lechleri Eichl.

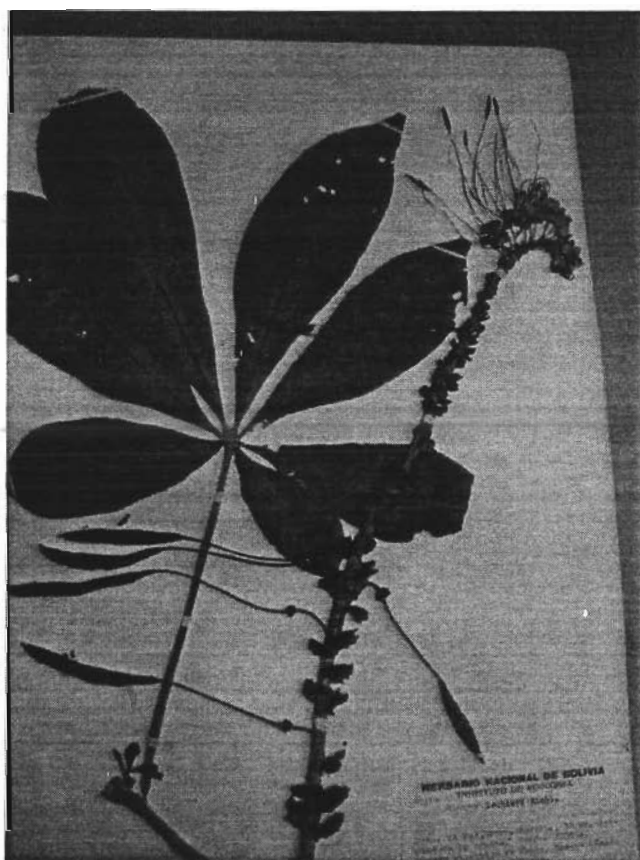
Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.

Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: RM3022.

Lieu de collecte: 23.9 Km. de la digue de Zongo.

Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Compositae

Environ 1000 genres et quelque 2000 espèces distribuées autour de la planète. Famille très cultivée à des fins utiles en particulier alimentaires comme le tournesol (*Helianthus annuus*), la laitue (*Lactuca sativa*), la cardé (*Cynara cardunculus*), l'artichaut (*Cynara scolymus*) et beaucoup d'autres. Nombres d'entre elles sont décoratives, médicinales et vénéneuses.

Genre collecté: *Baccharis*

Espèce collectée: *Baccharis pentlandii* DC.

Genre collecté: *Barnadesia*

Espèce collectée: *Barnadesia pycnophylla* Muschl.

Genre collecté: *Liabum*

Espèces collectées: *Liabum foliosum* (Rusby) Ferreira.

Liabum hastifolium Poepp. & Endl.

Liabum pinnulosum Kuntze.

Genre collecté: *Oyedaea*

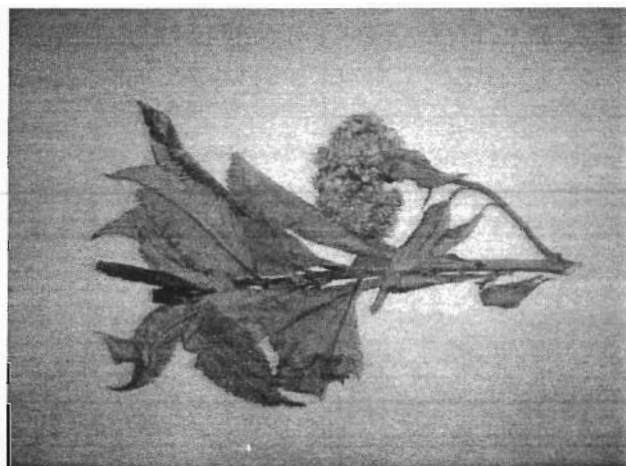
Espèce collectée: *Oyedaea boliviana* Britton.

Genre collecté: *Polymnia*

Espèce collectée: *Polymnia parviceps* S. F. Blake.

***Baccharis pentlandii* DC.**

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Altitudinal.
N° d'herbier: SI-5.
Lieu de collecte: 15 Km. de la digue de Zongo. Barrage hydroélectrique de Botijlaja.
Ecosystème et altitude: Paramo Yungeño (3600- 4200 msnm).
Usage traditionnel: Feuilles: contre la toux, les dislocations et les rhumatismes. Elles sont sudorifiques, antiseptiques et cicatrisantes.



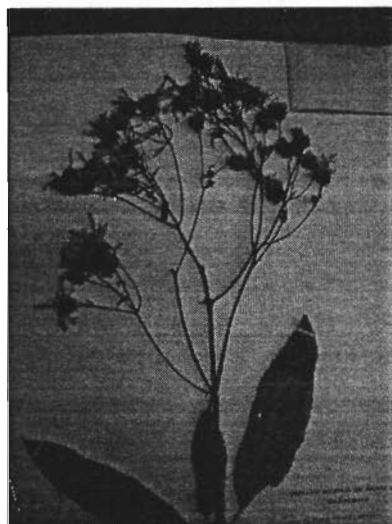
***Barnadesia pycnophylla* Muschl.**

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Chimio-taxonomique.
N° d'herbier: RM3017.
Lieu de collecte: 17.3 Km. de la digue de Zongo. Après le Barrage hydroélectrique de Botijlaja.
Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).



***Liabum foliosum* (Rusby) Ferreira**

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Chimio-taxonomique.
N° d'herbier: RM3030.
Lieu de collecte: 22.6 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



***Liabum hastifolium* Poepp. &Endl.**

Critère de collecte: Chimio-taxonomique.
Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.
N° d'herbier: RM3002.
Lieu de collecte: 26 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).
Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
N° d'herbier: RM3023.
Lieu de collecte: 26 Km. de la digue de Zongo, près de la cascade.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



***Liabum pinnulosum* Kuntze**

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Chimio-taxonomique.
N° d'herbier: RM3020.
Lieu de collecte: 23.7 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



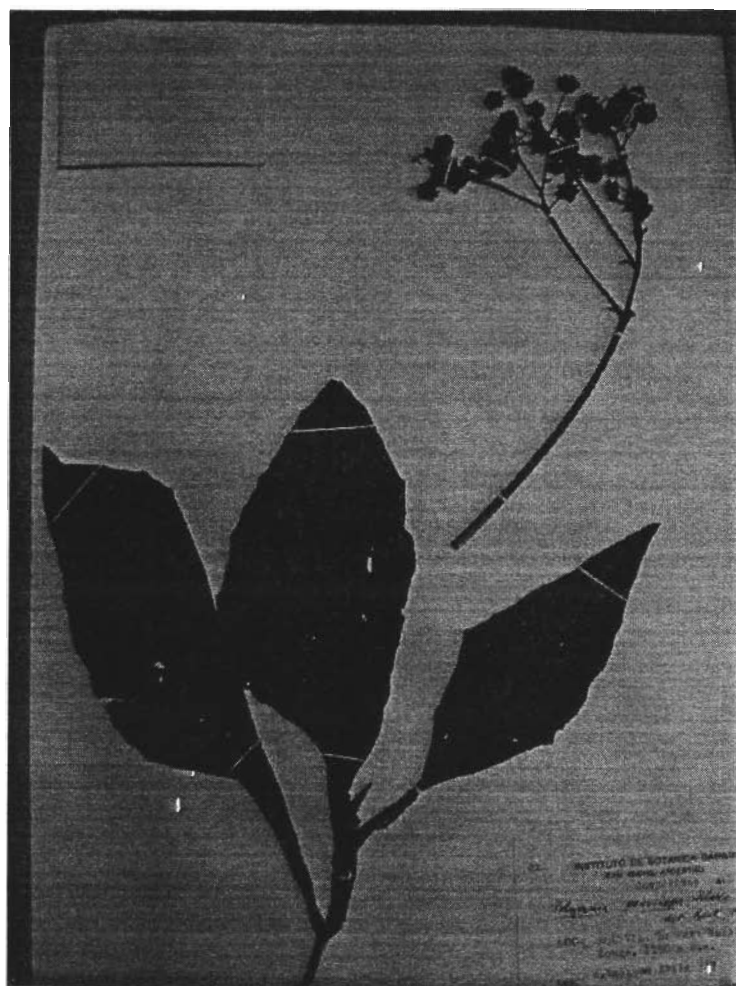
***Oyedaea boliviana* Britton**

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Chimio-taxonomique.
N° d'herbier: RM3028.
Lieu de collecte: 31.9 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



***Polymnia parviceps* S. F. Blake**

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Chimio-taxonomique.
N° d'herbier: RM3029.
Lieu de collecte: 31.9 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Elaeocarpaceae

La Famille est représentée par 12 genres et environ 120 espèces dans les zones tropicales et subtropicales des deux hémisphères. Nombreuses sont les espèces décoratives et dans quelques régions, leurs fruits sont comestibles.

Genre collecté: *Vallea*

Espèce collectée: *Vallea stipularis* L.f.

Vallea stipularis L.f.

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.

Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: SI-17.

Lieu de collecte: 19 Km. de la digue de Zongo.

Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).



Euphorbiaceae

Environ 300 genres et 5000 espèces distribuées dans le monde entier. Nombres d'entre elles sont utiles comme le manioc (*Manihot esculenta*), le ricin (*Ricinus communis*), l'arbre à caoutchouc (*Hevea brasiliensis*).

Genre collecté: *Alchornea*

Espèce collectée: *Alchornea cf. glandulosa* Poepp.

Alchornea cf. glandulosa Poepp.

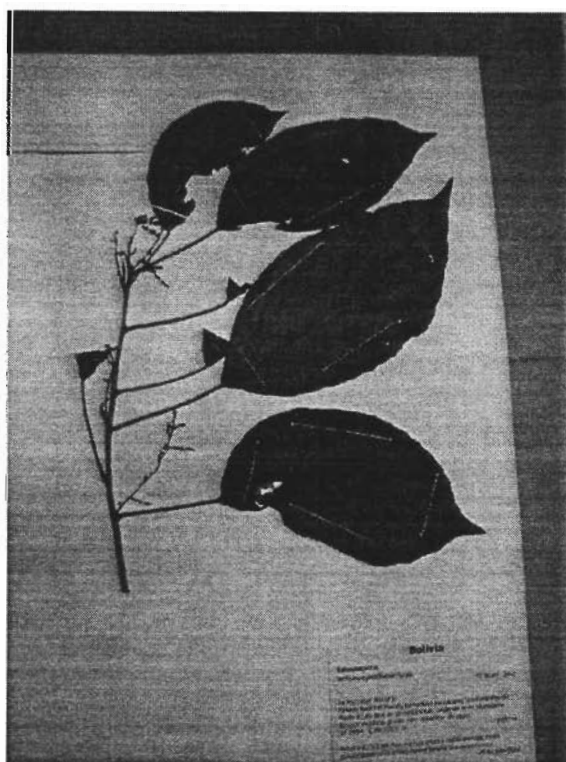
Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.

Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: RM3009.

Lieu de collecte: 43 Km. de la digue de Zongo.

Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Guttiferae

Présente 40 genres et environ 1000 espèces dans les zones tropicales
des deux hémisphères.

Genre collecté: *Clusia*

Espèces collectées: *Clusia cf. flaviflora* Engl.

Clusia martiana Engl.

Clusia cf. polyantha Cuatrec.

Clusia sp.

Genre collecté: *Vismia*

Espèces collectées: *Vismia glaziovii* Ruhland (=V. Vuchtienii
Ewan).

Clusia cf. flaviflora Engl.

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.

Critère de collecte: Organo-leptique, latex de couleur orange.

N° d'herbier: RM2998.

Lieu de collecte: 19- 20 Km. de la digue de Zongo, avant de
traverser la rivière (antenne).

Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-
3600msnm).



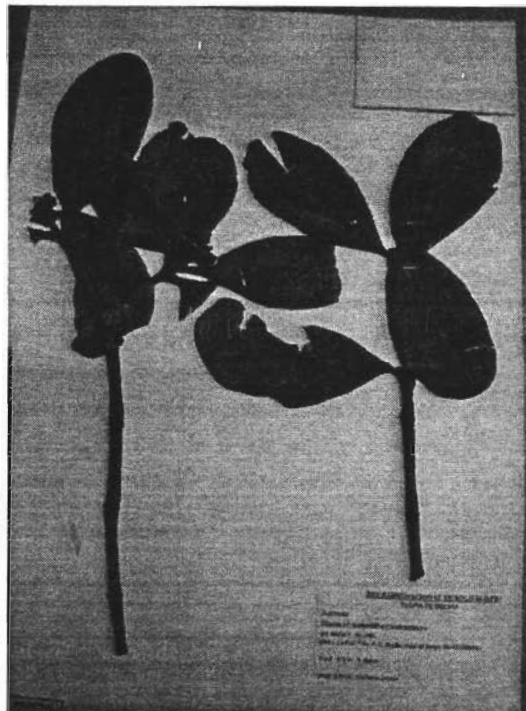
***Clusia martiana* Engl.**

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.
Critère de collecte: Organo-leptique, latex de couleur orange.
N° d'herbier: RM3008.
Lieu de collecte: 43 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



***Clusia cf. polyantha* Cuatrec.**

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.
Critère de collecte: Organo-leptique, latex de couleur orange.
N° d'herbier: RM3012.
Lieu de collecte: 43 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Clusia sp.

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Organo-leptique, latex de couleur orange.
N° d'herbier: SI- 10.
Lieu de collecte: 42 Km de la retenue de Zongo. Avant le barrage hydroélectrique de Cahua
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel: Suc: purgatif, vermifuge, désinfectant, les luxations, les entorses, les maladies pulmonaires, les douleurs rénales, les dislocations osseuses, les pratiques magico- religieuses.



***Vismia glaziovii* Ruhland (=V. Vuchtienii Ewan)**

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.
Critère de collecte: Altitudinal.
N° d'herbier: RM3007.
Lieu de collecte: 45 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Haloragidaceae

(Gunneraceae)

Est représentée par 6 genres et environ 160 espèces amplement distribuées dans les régions tempérées et subtropicales.

Genre collecté: *Gunnera*

Espèce collectée: *Gunnera cf. apiculata* Schindl.

Gunnera cf. apiculata Schindl.

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.

Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: RM3000.

Lieu de collecte: 42 Km. de la digue de Zongo au bord du canal.

Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Iridaceae

Est représentée par 60 genres et environ 800 espèces de distribution cosmopolite. Plusieurs d'entre elles sont cultivées comme plantes décoratives. Les styles de *Crocus sativus* constituent le safran.

Genre collecté: *Crocasmia*

Espèce collectée: *Crocasmia x crocosmiiflora* (Lemoine ex E. Morren) N.E.Br.

Crocasmia x crocosmiiflora (Lemoine ex E. Morren) N.E.Br.

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.

Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: SI- 26.

Lieu de collecte: 23 Km. de la digue de Zongo. Piscine du barrage hydroélectrique de Cuticucho.

Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Juncaceae

La famille est représentée par 8 genres et environ 300 espèces, elles poussent spécialement dans les sols humides.

Genre collecté: *Distichia*

Espèce collectée: *Distichia muscoides* Nees & Meyen.

Distichia muscoides Nees & Meyen

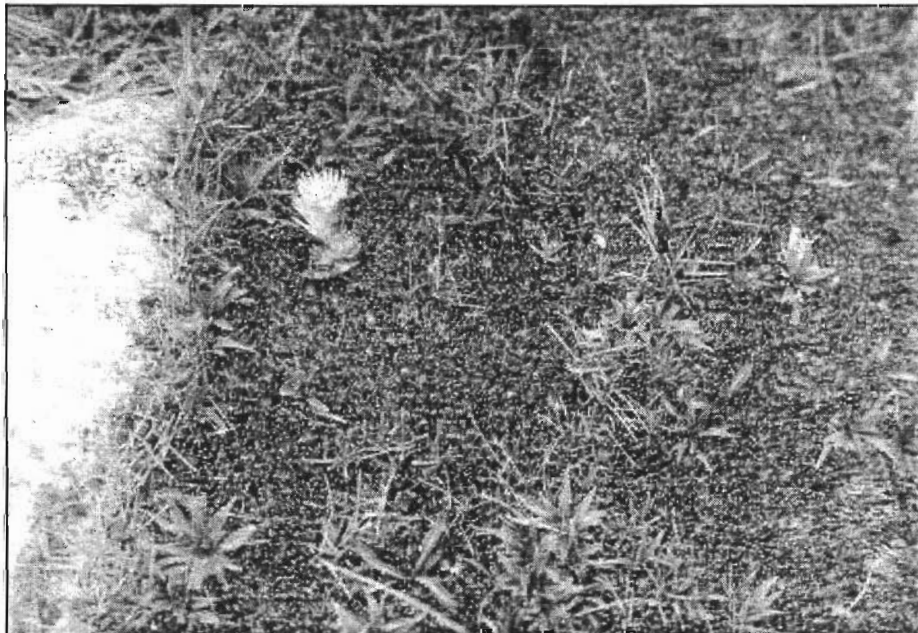
Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.

Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: SI- 24.

Lieu de collecte: Enneigé Huayna Potosi, lagune Patakisota.

Ecosystème et altitude: Prairie haute andine (4200- 4800 msnm).



Labiatae

La famille est représentée par environ 200 genres et quelque 3200 espèces, amplement distribuées dans les régions chaudes et tempérées du globe. Plusieurs d'entre-elles sont cultivées comme plantes aromatiques ou décoratives: le romarin ((*Rosmarinus officinalis* L), l'orégan (*Origanum vulgare*), le thym (*Thymus vulgaris*), les menthes (*Mentha* sps.).

Genre collecté: *Minthostachys*

Espèce collectée: *Minthostachys cf. acutifolia* Epling.

Genre collecté: *Stachys*

Espèce collectée: *Stachys aperta* Epling.

Minthostachys cf. acutifolia Epling.

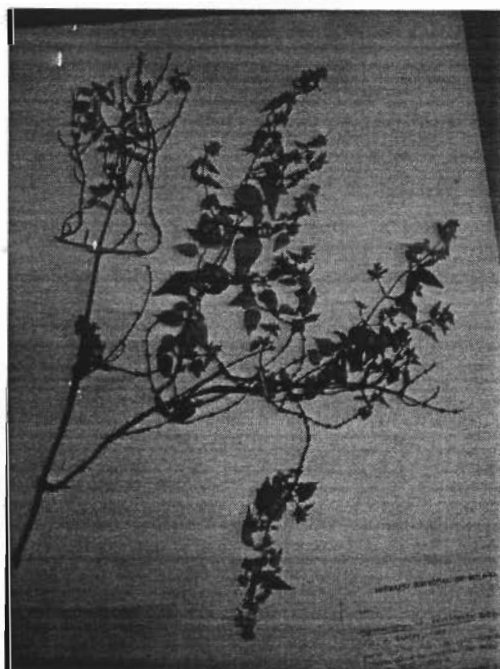
Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.

Critère de collecte: Chimio-taxonomique.

N° d'herbier: RM3026.

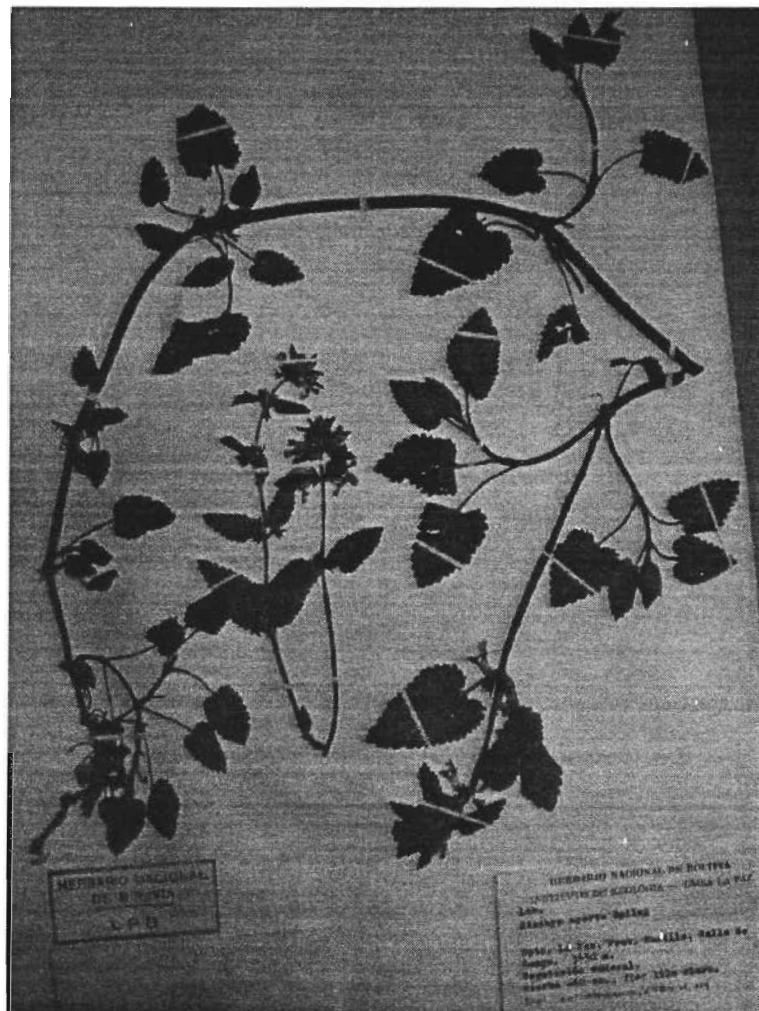
Lieu de collecte: 26 Km. de la digue de Zongo, cascade.

Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Stachys aperta Epling.

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Altitudinal.
N° d'herbier: RM3025.
Lieu de collecte: 26 Km. de la digue de Zongo, cascade.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Leguminosae. Papilionoideae

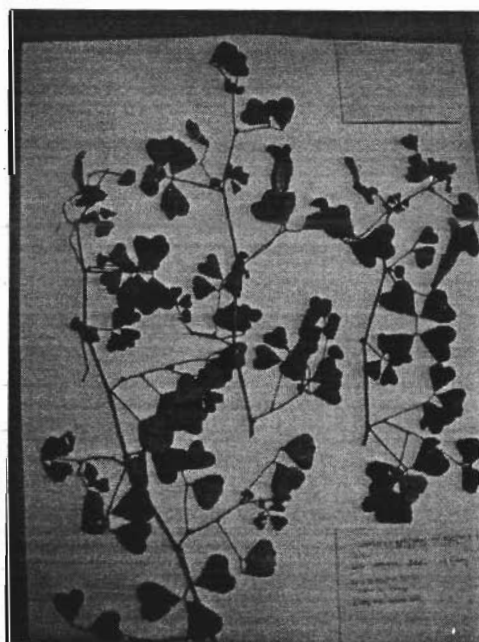
La famille est représentée par 600 genres et plus de 12000 espèces distribuées autour du globe. Parmi elles, il y a de nombreuses espèces alimentaires: les pois chiches (*Phaseolus* sps.), les fèves (*Vicia faba*), les lentilles (*Lens culinaris*), les petits pois (*Pisum sativum*), etc. D'autres sont fourragères comme la luzerne (*Medicago sativa*), le trèfle (*Trifolium repens*), etc. D'autres sont utilisées comme textiles, industrielles ou médicinales.

Genre collecté: *Amicia*

Espèce collectée: *Amicia lobbiana* Benth. ex Rusby.

Amicia lobbiana Benth. ex Rusby

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Altitudinal.
N° d'herbier: RM3021.
Lieu de collecte: 23.7 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Lichen

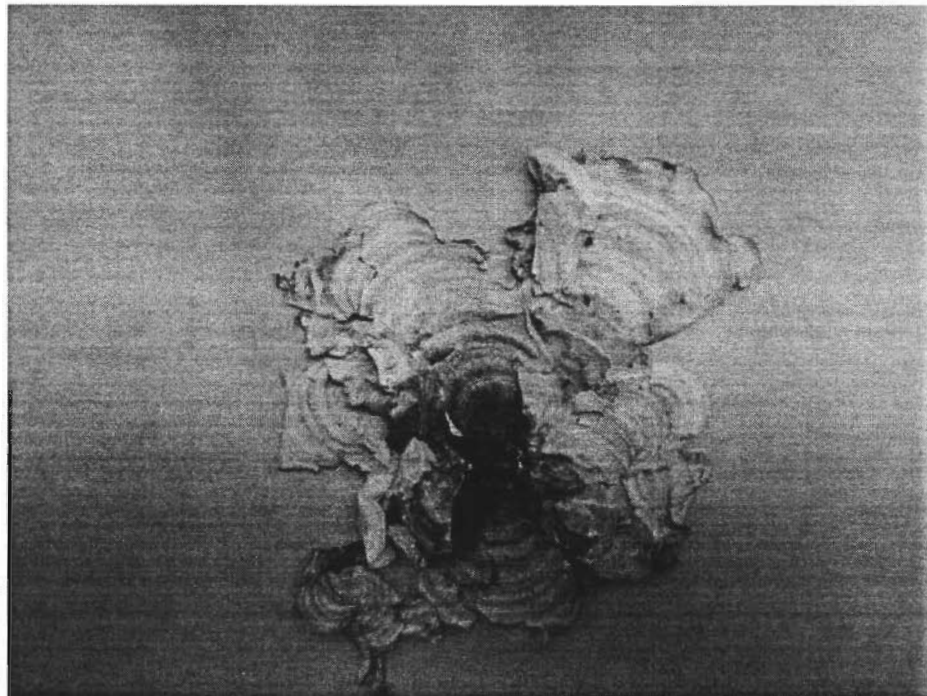
Présente plus de 16000 espèces de grande distribution dans le monde.

Genre collecté: *Dictyonema*

Espèce collectée: *Dictyonema glabratum* (Spreng.) D. Hawksw.

Dictyonema glabratum (Spreng.) D. Hawksw

Critère de collecte: Organoleptique, bleu.
Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
N° d'herbier: SI- 22.
Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.
N° d'herbier: RM3006.
Lieu de collecte: 45 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Loranthaceae

La famille est représentée par 38 genres et plus de 1400 espèces.

Genre collecté: *Gaiadendron*

Espèce collectée: *Gaiadendron punctatum* (Ruiz & Pav.) G.
Don.

Gaiadendron punctatum (Ruiz & Pav.) G. Don.

Critère de collecte:	Organolectique, feuilles jeunes de couleur rouges.
Date de collecte:	29 octobre 2001. Collecte I.
N° d'herbier:	SI- 19.
Lieu de collecte:	19 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude:	Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).
Date de collecte:	29 mai 2002. Collecte III.
N° d'herbier:	RM3018.
Lieu de collecte:	18.4 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude:	Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel:	Feuilles et fleurs: contre les douleurs de la matrice. Fleurs: sont hémostatiques.



Melastomataceae

Présente environ 240 genres et quelques 3000 espèces en zones tropicales et subtropicales.

Genre collecté:	<i>Brachyotum</i>
Espèce collectée:	<i>Brachyotum microdon</i> (Naudin) Triana.
Genre collecté:	<i>Miconia</i>
Espèce collectée:	<i>Miconia boliviensis</i> Cogn.

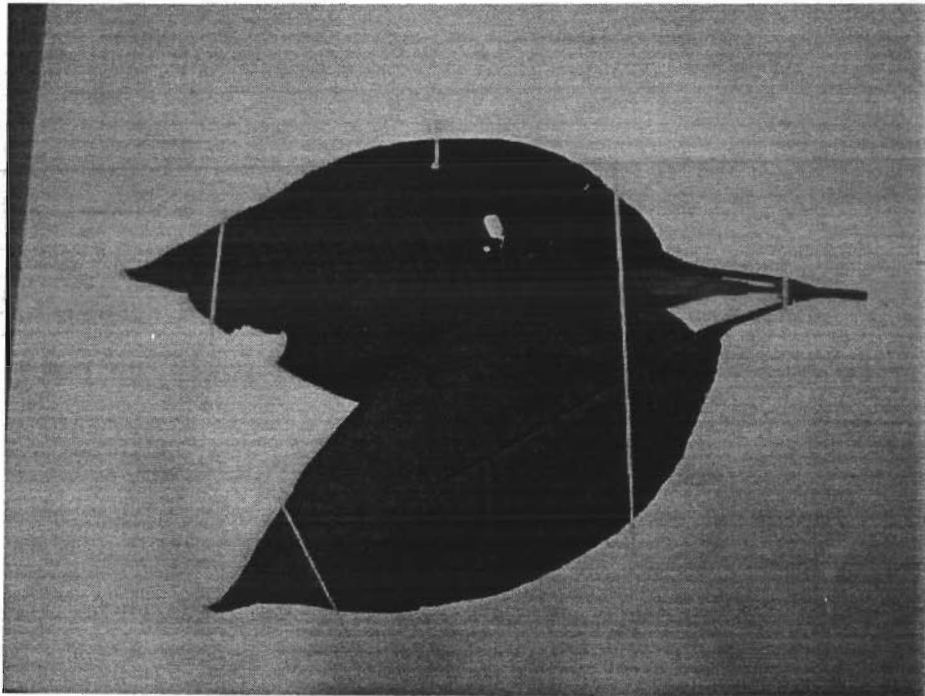
Brachyotum microdon (Naudin) Triana

Critère de collecte:	Organoleptique, fleur de couleur lilas.
Date de collecte:	29 octobre 2001. Collecte I.
N° d'herbier:	SI- 16.
Date de collecte:	28 février 2002. Collecte II.
N° d'herbier:	RM2997.
Lieu de collecte:	19-20 Km. de la digue de Zongo.
Date de collecte:	29 mai 2002. Collecte III.
N° d'herbier:	RM3031.
Lieu de collecte:	21.6 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude:	Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).
Usage traditionnel:	Feuilles: contre les maladies vénériennes.



Miconia boliviensis Cogn.

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Altitudinal.
N° d'herbier: RM3019.
Lieu de collecte: 23.7 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Onagraceae

21 genres avec quelque 640 espèces. Elles sont utilisées comme plantes décoratives, spécialement celles du genre *Fuchsia*.

Genre collecté: *Fuchsia*

Espèces collectées: *Fuchsia boliviana* Carriere.

Fuchsia cf. denticulata Ruiz & Pav.

Fuchsia boliviana Carriere

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.

Critère de collecte: Organoleptique, fleur de couleur rose.

N° d'herbier: RM3003.

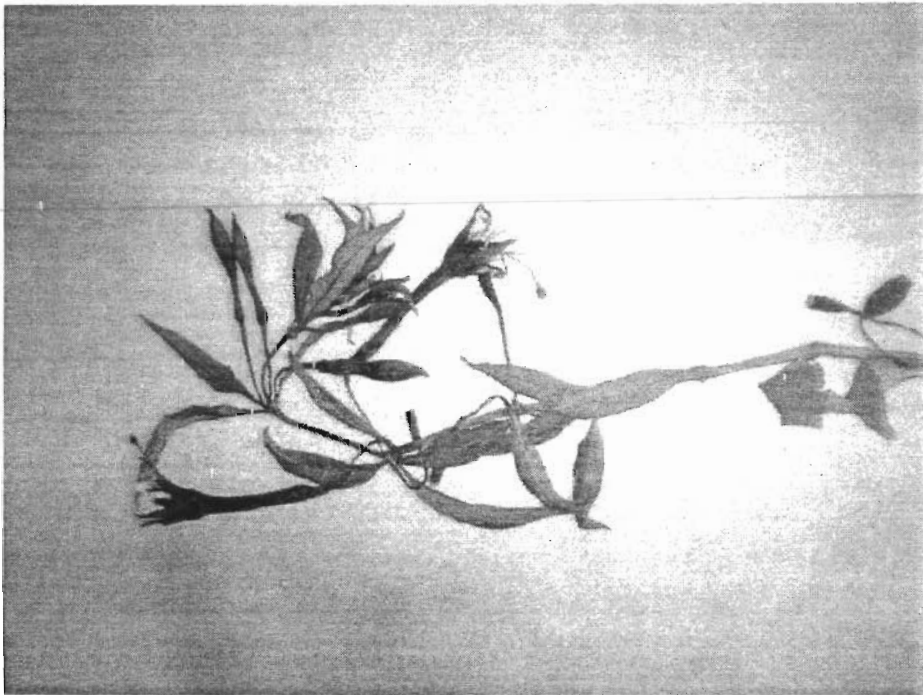
Lieu de collecte: 26 Km. de la digue de Zongo.

Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



***Fuchsia cf. denticulata* Ruiz & Pav.**

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Organoleptique, fleur de couleur fuchsia.
N° d'herbier: SI- 13.
Lieu de collecte: 21.7 Km. de la digue de Zongo, cascade.
Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).



Papaveraceae

40 genres et 700 espèces. Le pavot (*Papaver somniferum*) se cultive pour extraire la morphine. D'autres genres sont des espèces décoratives.

Genre collecté: *Bocconia*

Espèce collecté: *Bocconia integrifolia* Humb. & Bonpl.

Bocconia integrifolia Humb. & Bonpl.

Date de collecte:	29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte:	Altitudinal.
N° d'herbier:	RM3024.
Lieu de collecte:	26 Km. de la digue de Zongo, cascade.
Ecosystème et altitude:	Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel:	Feuilles: contre les affections pulmonaires et la bronchite. Elles sont antiseptiques et somnifères. Graines: contre la pneumonie. Elles sont purgatives et vermifuges. Racine: contre la jaunisse et l'hydropisie.



Passifloraceae

Présente 12 genres avec quelque 600 espèces tropicales et subtropicales principalement en Amérique.

Genre collecté: *Passiflora*

Espèce collectée: *Passiflora amethystina* J.C. Mikan.

Passiflora amethystina J.C. Mikan

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.

Critère de collecte: Organoleptique, fleur de couleur lilas.

N° d'herbier: RM3004.

Lieu de collecte: 28 Km. de la digue de Zongo. Proche à l'école Cambaya.

Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).

Usage traditionnel: Feuilles: antiseptiques. Fruits: fébrifuges. Racine : somnifère (*Passiflora* sp.).



Polemoniaceae

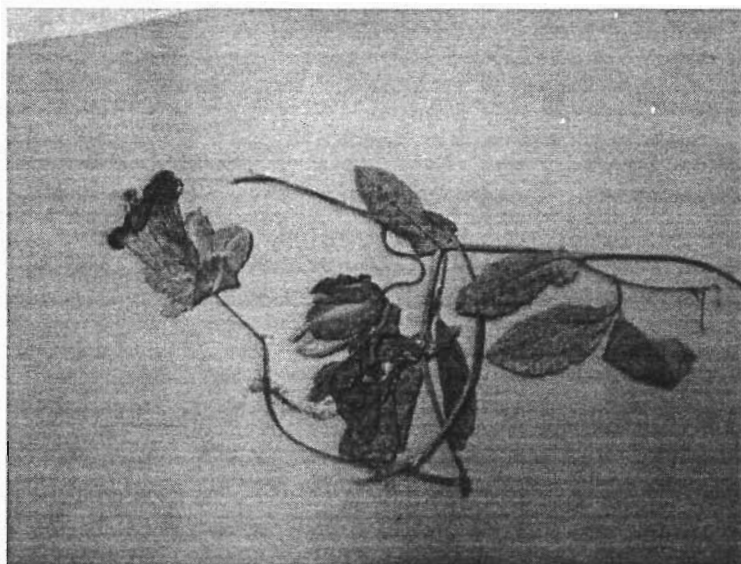
13 genres et quelque 300 espèces originaires d'Europe, d'Asie et d'Amérique. A cette famille appartient la "Fleur de l'Inca" (*Cantua buxifolia* Lam), fleur nationale de la Bolivie et du Pérou. C'est une plante décorative.

Genre collecté: *Cobaea*

Espèce collectée: *Cobaea scandens* Cav.

Cobaea scandens Cav.

Critère de collecte:	Organoleptique, fleur de couleur lilas.
Date de collecte:	29 octobre 2001. Collecte I.
N° d'herbier:	SI- 3.
Lieu de collecte:	28 Km. de la digue de Zongo. Après le barrage hydroélectrique de Santa Rosa.
Date de collecte:	28 février 2002. Collecte II.
N° d'herbier:	RM3005.
Lieu de collecte:	31 Km. de la digue de Zongo.
Date de collecte:	29 mai 2002. Collecte III.
N° d'herbier:	RM3027.
Lieu de collecte:	33 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude:	Yungas (800- 2800 msnm).



Polygalaceae

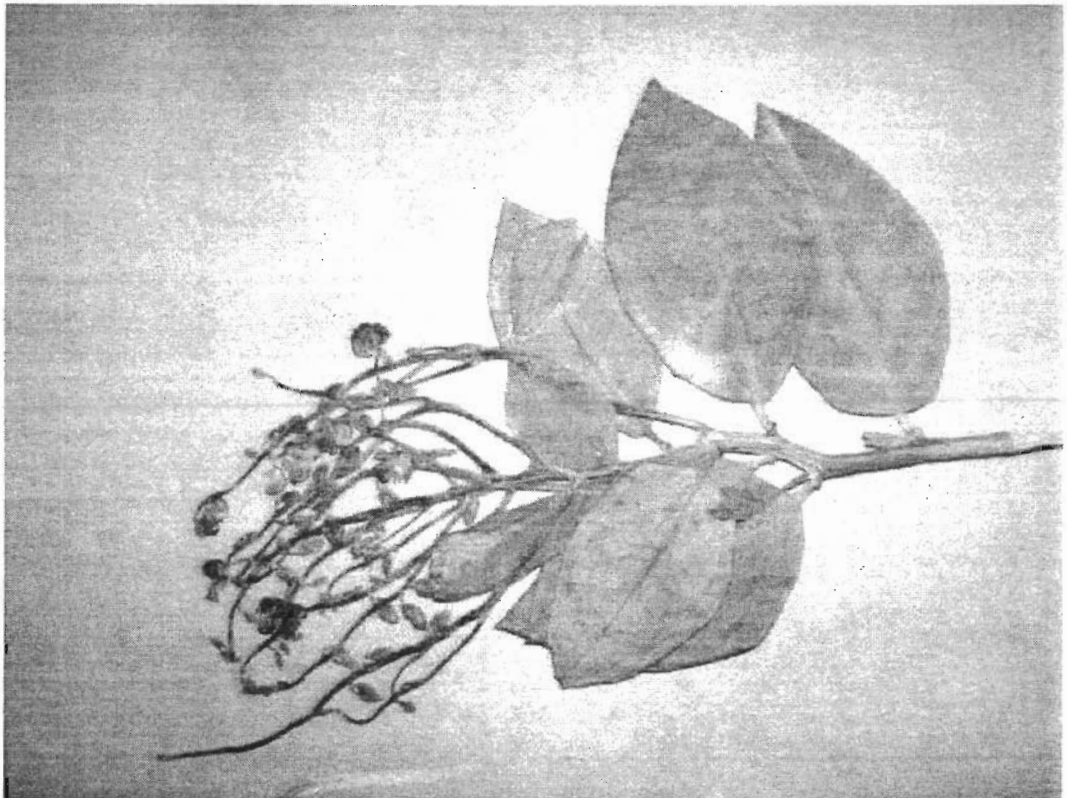
Présente quelque 12 genres avec environ 800 espèces de grande distribution.

Genre collecté: *Monnina*

Espèce collectée: *Monnina bridgesii* Chodat.

Monnina bridgesii Chodat

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Organoleptique, fruit de couleur bleu.
N° d'herbier: SI-12.
Lieu de collecte: 21.7 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).
Usage traditionnel: Feuilles: contre la dysenterie. Feuilles et fleurs: contre les furoncles et les rhumatismes.



Polygonaceae

Famille avec environ 30 genres et 700 espèces. *Fagopyron esculentum* Moench. est le blé sarrasin qui se cultive comme pseudocéréale principalement en Russie. *Rheum raponticum* L. est la rhubarbe comestible.

Genre collecté: *Rumex*

Espèces collectées: *Rumex acetosella* L.

Rumex obtusifolius L.

Rumex sp.

Rumex sp.

Rumex sp.

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.

Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: SI-6.

Lieu de collecte: 11.8 Km. de la digue de Zongo.

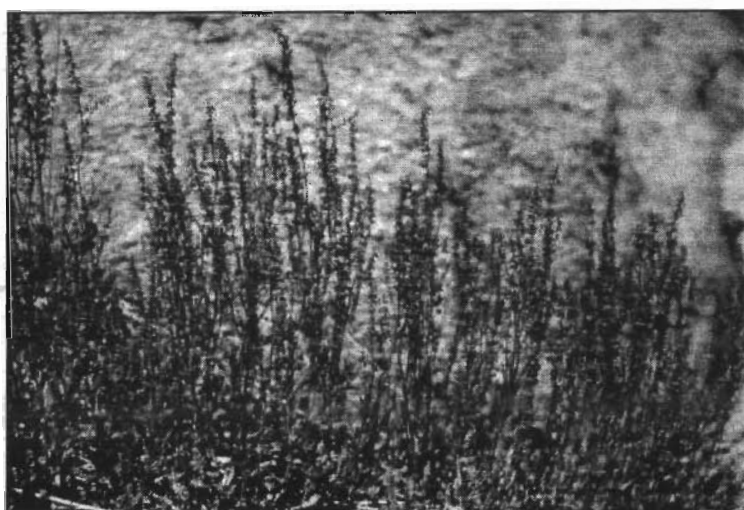
Ecosystème et altitude: Paramo Yungeño (3600- 4200 msnm).

Usage traditionnel: Feuilles: contre les affections hépatiques, les contusions et la furonculose. Elles sont désinfectantes et cicatrisantes.



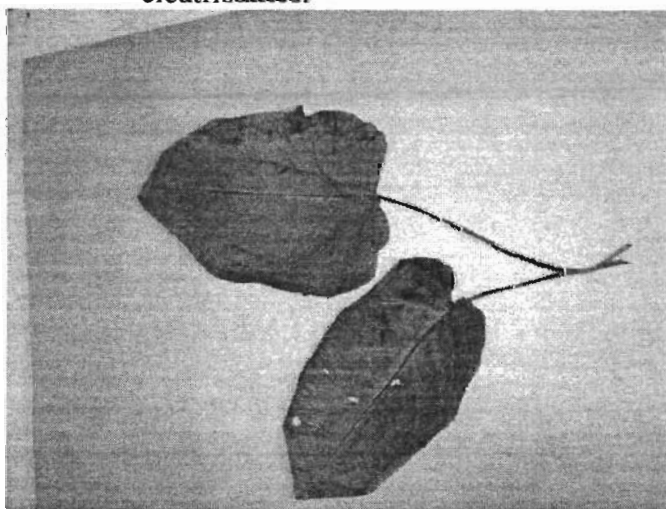
***Rumex acetosella* L.**

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Organoleptique, couleur rouge.
N° d'herbier: RM3013.
Lieu de collecte: 11.8 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Paramo Yungeño (3600- 4200 msnm).
Usage traditionnel: Feuilles: contre les affections hépatiques, les contusions et la furonculose. Elles sont désinfectantes et cicatrisantes.



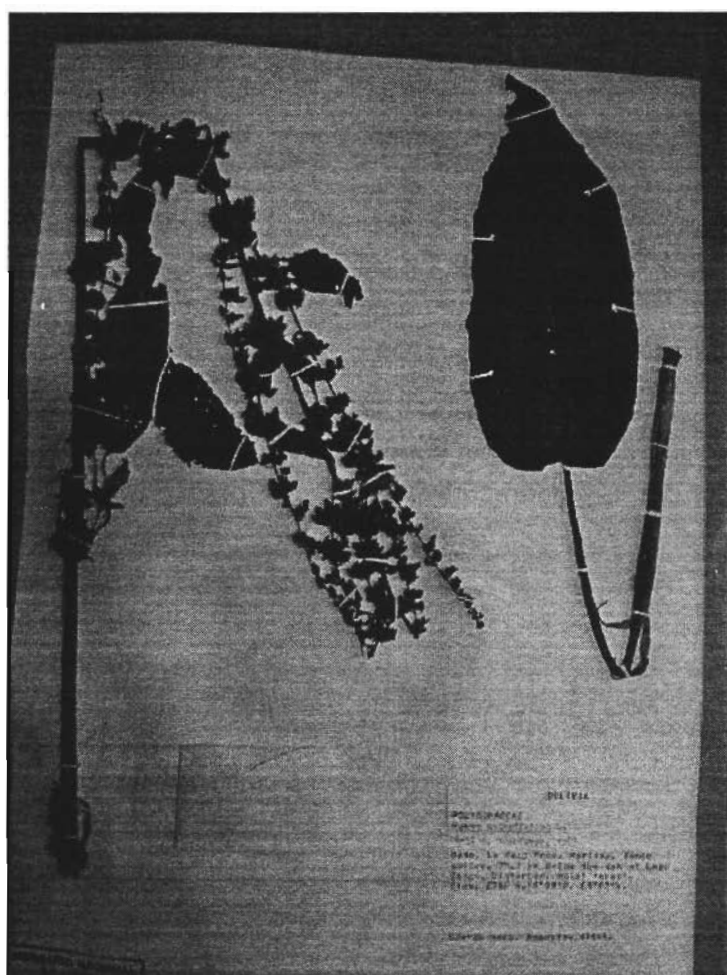
***Rumex* sp.**

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Altitudinal.
N° d'herbier: SI-7.
Lieu de collecte: 22 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel: Feuilles: contre les affections hépatiques, les contusions et la furonculose. Elles sont désinfectantes et cicatrisantes.



Rumex obtusifolius L

Date de collecte:	29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte:	Altitudinal.
N° d'herbier:	SI- 9.
Lieu de collecte:	22 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude:	Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel:	Feuilles: contre les affections hépatiques, les contusions, la furonculose et les dermatoses. Ils sont désinfectants et cicatrisants. Racines: comme tonique antianémique. Ils sont purgatifs.



Polypodiaceae

Présente environ 50 genres et quelque 500 espèces

Genre collecté: *Elaphoglossum*

Espèce collectée: *Elaphoglossum mathewssi* (Fée) T. Moore.

Elaphoglossum mathewssi (Fée) T. Moore

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Altitudinal.
N° d'herbier: RM3015.
Lieu de collecte: 13.8 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Paramo Yungeño (3600- 4200 msnm).
Usage traditionnel: Racines: contre les maladies vénériennes. Elles sont diurétiques (*Elaphoglossum* sp.)

Pteridaceae

La famille est représentée par environ 35 genres dont 22 en Amérique.

Genre collecté: *Polystichum*

Espèce collectée: *Polystichum pycnolepis* (Klotzsch) T. Moore.

Polystichum pycnolepis (Klotzsch) T. Moore

Date de collecte: 29 mai 2002. Collecte III.
Critère de collecte: Altitudinal.
N° d'herbier: RM3014.
Lieu de collecte: 13.8 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Paramo Yungeño (3600- 4200 msnm).

Rosaceae

La famille est représentée par 1500 genres et 3200 espèces distribuées autour du globe. Très utilisée par l'homme pour ses fruits comestibles. La fraise (*Fragaria vesca* y *Fragaria chiloensis*), la pêche (*Prunum persica*), l'abricot (*P. armeniaca*), la cerise (*P. Avium*), la poire (*Pyrus communis*), etc. D'autres espèces se cultivent comme des plantes décoratives: les rosiers (*Rosa* sps.).

Genre collecté: *Acaena*

Espèce collecté: *Acaena cylindrostachya* Ruiz & Pav.

Genre colecté: *Lachemilla*

Espèce colecté: *Lachemilla pectinata* (Kunth) Rothm.

Genre colecté: *Rubus*

Espèce colecté: *Rubus briareus* Focke.

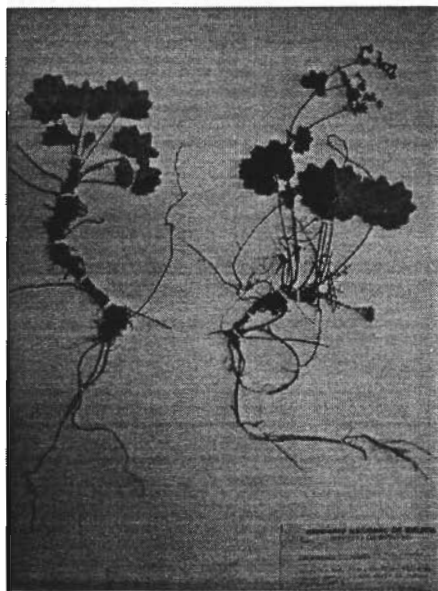
Acaena cylindrostachya Ruiz & Pav

Date de collecte:	28 février 2002. Collecte II.
Critère de collecte:	Altitudinal.
N° d'herbier:	RM2992.
Lieu de collecte:	14 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude:	Paramo Yungeño (3600- 4200 msnm).
Usage traditionnel:	Feuilles, fleurs, tiges et racines: contre les maladies de cœur, les maladies de foie et l'hydropisie.



***Lachemilla pectinata* (Kunth) Rothm.**

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.
Critère de collecte: Altitudinal.
N° d'herbier: RM2994.
Lieu de collecte: 19-20 Km. de la digue de Zongo, avant de traverser la rivière.
Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).



***Rubus briareus* Focke**

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Organoleptique, fruit de couleur lilas.
N° d'herbier: SI- 25.
Lieu de collecte: 19 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).
Usage traditionnel: Racines: contre les angines et la constipation. Elles sont anti-inflammatoires.



Rubiaceae

La famille est représentée par 500 genres et 600 espèces principalement tropicales et subtropicales. Plusieurs d'entre elles sont utiles à l'homme: le café (*Coffea arabica* L.), les quinquinas (*Cinchona* spp.) desquels on extrait la quinine (antipaludique)

Genre collecté: *Condaminea*

Espèce collectée: *Condaminea corymbosa* (Ruiz & Pav.)DC.

Condaminea corymbosa (Ruiz & Pav.)DC.

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.
Critère de collecte: Chimio-taxonomique.
N° d'herbier: RM3010.
Lieu de collecte: 43 Km. de la digue de Zongo.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).



Saxifragaceae

Présente environ 80 genres et quelque 3000 espèces distribuées
autour du globe.

Genre collecté: *Escallonia*

Espèce collecté: *Escallonia myrtilloides* L.f.

Escallonia myrtilloides L.f.

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.

Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: RM2991.

Lieu de collecte: 14 Km. de la digue de Zongo.

Ecosystème et altitude: Paramo Yungeño (3600- 4200 msnm).



Scrophulariaceae

La famille est représentée par 200 genres et 300 espèces. Quelques-unes d'entre-elles sont décoratives.

Genre collecté: *Agalinis*

Espèce collectée: *Agalinis chaparensis* Barringer.

Agalinis chaparensis Barringer

Date de collecte: 28 février 2002. Collecte II.

Critère de collecte: Altitudinal.

N° d'herbier: RM2996.

Lieu de collecte: 19- 20 Km. de la digue de Zongo, avant de traverser la rivière (antenne)

Ecosystème et altitude: Sourcil de montagne de Yungas (2800-3600msnm).



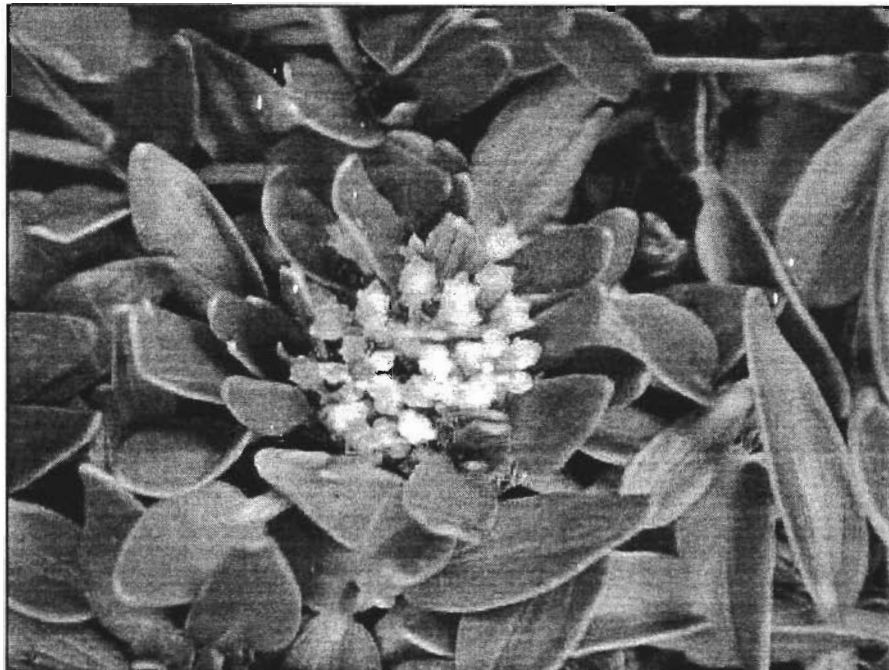
Umbelliferae

La famille est représentée par 275 genres et plus de 2900 espèces amplement distribuées. Quelques-unes d'entre elles sont comestibles comme la carotte (*Daucus carota*) ou servent de condiments comme le persil (*Petroselinum crispum*), l'anis (*Pimpinella anisum*), le cumin (*Carum carvi*), etc.

Genre collecté: *Azorella*
Espèce collectée: *Azorella sp.*

Azorella sp.

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Altitudinal.
N° d'herbier: SI- 21.
Lieu de collecte: Enneigé Huayna Potosi, antenne.
Ecosystème et altitude: Prairie haute andine (4200- 4800 msnm).
Usage traditionnel: Racines: contre les fièvres d'origine pulmonaires et les vomissements. Suc des tiges: contre les dislocations osseuses



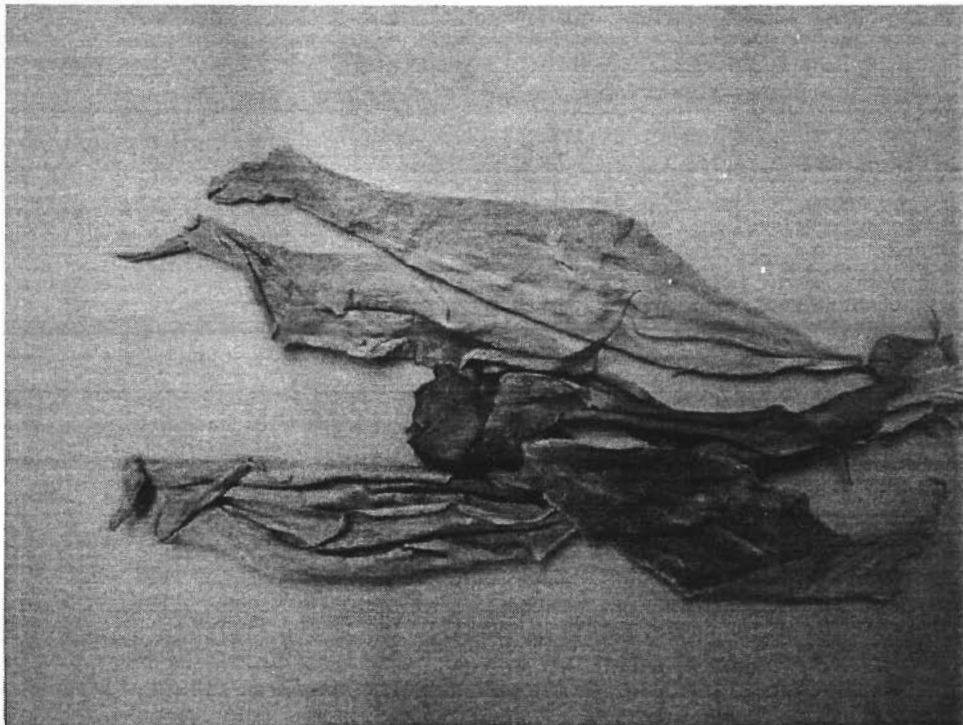
Zingiberaceae

La famille est représentée par 47 genres et quelque 1300 espèces dans les régions tropicales.

Genre collecté: *Costus*
Espèce collecté: *Costus sp.*

Costus sp.

Date de collecte: 29 octobre 2001. Collecte I.
Critère de collecte: Organoleptique, feuilles de couleurs rouges.
N° d'herbier: SI- 11.
Lieu de collecte: 34 Km. de la digue de Zongo. Après le barrage hydroélectrique de Chururaqui.
Ecosystème et altitude: Yungas (800- 2800 msnm).
Usage traditionnel: Feuilles: contre les contusions, la fièvre typhoïde et les douleurs stomacales et intestinales. Tiges: sont fébrifuges et antiseptiques sur les chancres vénériens (*Costus argenteus*).



3.Extraction et purification des composés obtenus des plantes étudiées

A.Travaux réalisés sur *Brachyotum microdon* (Melastomataceae)

Le Tableau # 38 présente les résultats du test FBIT des différents extraits des feuilles de *Brachyotum microdon*.

Extrait	FBIT % inhibition [2.5 mg/ml] ¹	FBIT % inhibition [1.25 mg/ml] ¹	FBIT % inhibition [0.25 mg/ml] ¹
Éther de pétrole	45	-	-
Dichlorométhane	64	64	53
Acétate d'éthyle	63	55	-
Méthanol	-	-	-

¹: 0.5 mg/ml de Cl- hémine

TABLEAU #38. Résultats du test FBIT d'extraits de *Brachyotum microdon*.

L'extrait actif (dichlorométhane, 31g) a été fractionné par chromatographie liquide sous vide (VLC, 5 x ø 10.5 cm, 70 g SiO₂, fractions de 250 ml) Le Tableau # 39 présente les fractions obtenues et le Tableau # 40 présente les résultats du test FBIT de chaque fraction séparée.

Tubes	Système de Solvant	Union	Fraction	Poids [mg]	% Rendement
1- 22	EP.	1- 3	BMI-43V1	277.2	0.9
	EP.	4- 22	BMI-43V2	196.5	0.6
23- 30	EP-DM (95%)	23- 30	BMI-43V3	55.7	0.2
31- 53	EP-DM (90%)	31- 53	BMI-43V4	2306.9	7.4
54- 61	EP-DM (85%)	54- 61	BMI-43V5	6904.4	22.3
62- 94	EP-DM (70%)	62- 94	BMI-43V6	3351.7	10.8
95- 120	EP-DM (50%)	95- 120	BMI-43V7	507.1	1.6
121- 135	DM	121- 135	BMI-43V8	2219.8	7.2
136- 147	DM-AcOEt (95%)	136- 147	BMI-43V9	760.1	2.5
148- 165	AcOEt	148- 151	BMI-43V10	1590.1	5.1
		152- 165	BMI-43V11	5560.9	17.9
166- 175	DM-M	166- 175	BMI-43V12	1478.3	4.8
176- 180	M	176- 180	BMI-43V13	65.2	0.2

E.P: Éther de pétrole, DM: Dichlorométhane, AcOEt: Acétate d'éthyle, M: Méthanol

TABLEAU #39. Fractions provenant de la séparation par VLC de *Brachyotum microdon*.

Fraction	% Inhibition [2.5 mg/ml]	% Inhibition [1.25 mg/ml]	% Inhibition [0.25 mg/ml]	CI₅₀ [mg/ml]
BMI-43V1	85	53	7	1.13
BMI-43V2	86	52	30	1.08
BMI-43V3	76	64	31	0.63
BMI-43V4	33	27	17	PA
BMI-43V5	61	71	21	0.63
BMI-43V6	55	59	40	0.58
BMI-43V7	74	84	69	< 0.25
BMI-43V8	72	75	54	< 0.25
BMI-43V9	58	63	51	0.25
BMI-43V10	51	54	47	0.58
BMI-43V11	22	16	1	PA
BMI-43V12	35	31	47	PA
BMI-43V13	41	0	0	PA

PA: Pas active

TABLEAU # 40. Résultats du test FBIT des fractions provenant de la séparation par VLC de *Brachyotum microdon*.

La fraction U (V7 à V9, 3.487 g) ont été postérieurement soumises à une séparation chromatographique FLASH dans une colonne de 24 x ø 6 cm chargée avec du gel de silice (350 g). Le Tableau # 41 présente les résultats de cette colonne.

Union	Système de Solvant	Nom	Poids [mg]	CI ₅₀ [mg/ml]
BMII-9F1	DM	BMII-14F1	47.3	P.A
BMII-9F2 a 9F7	DM	BMII-14F2	432.7	0.72
BMII-9F8	DM	BMII-14F3	51.7	0.47
BMII-9F9 a 9F11	DM	BMII-14F4	116.8	1.25
BMII-9F12	DM	BMII-14F5	32.9	0.50
BMII-9F13 a 9F14	DM	BMII-14F6	136.3	0.11
BMII-9F15 a 9F17	DM-AcOEt (99%)	BMII-14F7	354.5	0.21
BMII-9F18 a 9F20	DM-AcOEt (95%)	BMII-14F8	617.4	0.24
BMII-9F21 a 9F22	DM-AcOEt (95%)	BMII-14F9	222.3	< 0.063
BMII-9F23 a 9F27	DM-AcOEt (50%)	BMII-14F10	1810.2	PA
BMII-9F28	MeOH	BMII-14F11	231.4	PA

PA: Pas active à 1.25 mg/ml

Zone d'activité: +: IC₅₀ ≤ 0.5, ++: IC₅₀ ≤ 0.25, +++: IC₅₀ ≤ 0.1, ++++: IC₅₀ ≤ 0.05

TABLEAU # 41. Fractions provenant de la séparation par chromatographie FLASH de la fraction U.

La fraction BMII-14F3 a été soumise à une chromatographie en couche mince préparative (PCCM) éluée trois fois dans du chloroforme. On a obtenu 4 fractions dont les résultats de rendement et de test FBIT sont présentés dans le Tableau # 42.

Fraction	Nom	Poids [mg]	FBIT CI ₅₀ [mg/ml]
PC1	BMII-15K1	-	-
PC2	BMII-15K2	3.2	-
PC3	BMII-15K3	6.4	-
PC4	BMII-15K4 (C1)	18.6	0.2

TABLEAU # 42. Résumé de la purification de BMII-14F3.

La fraction BMII-14F7 a été chromatographiée sur gel de silice (30g, 54.2 x ϕ 1.5 cm) avec un système de solvant AcOEt-DM (3%). On a collecté 145 fractions de 15 ml. Grâce à la CCM, on a réduit le nombre de fractions à 5. Le Tableau #43 montre le bilan de la purification de cette fraction active.

Tubes	Fraction	Poids [mg]	FBIT CI_{50} [mg/ml]
1- 20	BMII-18K1	8.6	0.19
21- 26	BMII-18K2	93.4	-
27-35	BMII-18K3	157.2	0.24
36-62	BMII-18K4 (C2)	15.0	0.20
63-145	BMII-18K5	12.7	-

TABLEAU #43. Bilan de la purification de BMII-14F7.

La fraction BMII-14F9 (222.3 mg, CI_{50} = < 0.063) a été dissoute dans du méthanol, filtrée et le filtrat évaporé à sec. Le résidu soluble dans le méthanol (82.2 mg) a été soumis à une chromatographie d'exclusion moléculaire LH-20 (43 x 2.5cm.) et élué avec du méthanol. On a collecté 110 fractions de 5- 10 ml qui ont été réduites à 5. Le Tableau # 44 présente le bilan de la séparation de BMII-14F9.

Tubes	Fraction	Poids [mg]	FBIT CI_{50} [mg/ml]
1- 14	BMII-43L1	5.0	-
15- 33	BMII-43L2	20.4	-
34- 47	BMII-43L3	34.0	0.17
48- 62	BMII-43L4	21.2	-
63- 110	BMII-43L5	0.4	P.D.

P.D.: Pas de données.

TABLEAU # 44. Résumé de la purification de BMII-14F9 par chromatographie d'exclusion moléculaire sur LH-20.

La purification suivante a été celle de BMII-43L3 avec une PCCM éluée deux fois par du dichlorométhane. Le travail préparatif de chromatographie sur couche mince a permis d'obtenir 9 fractions, lesquelles sont détaillées dans le Tableau # 45.

Fraction	Nom	Poids [mg]	FBIT CI_{50} [mg/ml]
1	BMII- 55P1	0.9	P:D
2	BMII- 55P2	2.1	-
3	BMII- 55P3	0.1	P:E
4	BMII- 55P4	3.0	0.18
5	BMII- 55P5	1.5	0.13
6	BMII- 55P6	0.8	P:D
7	BMII- 55P7	3.4	0.80
8	BMII- 55P8 (C3)	9.0	0.61
9	BMII- 55P9	0.5	P.D.

P.D.: Pas de données.

TABLEAU #45. Résumé de la purification de BMII-43L3 moyennant une CCM préparative ou PCCM.

La fraction BMI-43V10 (1590.1 mg), provenant de la VLC initiale (Tableaux # 39 et 40) a été fractionnée moyennant une chromatographie FLASH. On a ainsi réalisé deux colonnes chargées avec de la phase normale, éluées avec un système de gradient de solvant en partant de AcOEt -c.Hexane (15 %) à l'acétate d'éthyle (100 %). Dans la première colonne (22 x \varnothing 2.5 cm, 33.5 g SiO_2) on a déposé 317 mg de BMI-43V10 et collecté 26 fractions de 50 ml. Grâce aux CCM, le nombre de fractions a été réduit à sept. Le Tableau # 46 présente le bilan de cette séparation. Sur la seconde colonne (13 x \varnothing 3 cm, 73 g SiO_2) on a déposé 752 mg de BMI-43V10 et collecté 28 fractions de 150 ml qui ont été regroupées en six. Le Tableau # 47 présente le bilan de cette séparation.

Tubes	Système de solvant	Fraction	Poids [mg]	FBIT Cl_{50} [mg/ml]
1- 10	AcOEt -c.Hexane (15 %)	BMIII-28N1	7.0	PE
11- 18	AcOEt -c.Hexane (30 %)	BMIII-28N2 (C4)	25.1	1.6
19- 20		BMIII-28N3	0.8	PE
21	AcOEt -c.Hexane (50 %)	BMIII-28N4	3.9	AE
22- 24		BMIII-28N5	28.1	PE
25		BMC-28N6	10.1	-
26	AcOEt	BMC-28N7	2.3	PE

P.D.: Pas de données

AE: essai après purification

TABLEAU #46. Résumé de la purification de BMI-43V10 (FLASH 34 g SiO_2).

Tubes	Système de solvant	Fraction	Poids [mg]
1- 6	AcOEt -c.Hexane (15 %)	BMC-31F1	-
7- 10	AcOEt -c.Hexane (30 %)	BMC-31F2 (C4)	80.2
11		BMC-31F3	7.7
12- 14	AcOEt -c.Hexane (50 %)	BMC-31F4	48.8
15- 26		BMC-31F5	105
27- 28	AcOEt	BMC-31F6	15.0

TABLEAU #47. Résumé de la purification de BMI-43V10 (FLASH 73 g SiO_2).

Les fractions BMIII-28N5 (28.1 mg) et BMC-31F4 (105 mg), unies sous le nom de BMC-32U (133.1), ont été soumises à une chromatographie FLASH en phase normal (17 g SiO_2 , 22.5 x ø 2 cm). En utilisant le système gradient de solvants (cyclohexane à 30 % AcOEt– cyclohexane) on a obtenu 147 fractions de 15 ml chacune réduites par regroupement à 6. Le Tableau # 48 présente le bilan de ce travail.

Tube	Système de solvant	Fraction	Poids [mg]
1- 8	AcOEt -c.Hexane (15 %)	BMC-32F1	-
9- 48		BMC-32F2	30.0
49- 55	AcOEt -c.Hexane (20 %)	BMC-32F3	2.0
56-74		BMC-32F4	2.1
75- 109	AcOEt -c.Hexane (30 %)	BMC-32F5	33.5
110- 147		BMC-32F6	32.7

TABLEAU # 48. Résumé de la purification de BMC-32U moyennant la chromatographie de type FLASH.

La fraction BMC-32F5 a été travaillée en HPLC sur une colonne Waters Xterra RP- 18 (5 μ m, 100 Å, 15 x \varnothing 0.5 cm) avec des injections analytiques (20- 100 μ g) et sur Waters Xterra RP- 18 (10 μ m, 19 x \varnothing 2.5 cm) pour des injections préparatives (5- 9 mg). Nous avons utilisé une variété de systèmes de solvants pour obtenir la majeure séparation des signaux observés sur les chromatogrammes. Le Tableau # 49 montre les fractions obtenues des HPLC préparative de BMC-32F5 en utilisant le mélange MeOH-H₂O:TFA 0.1% (80:20). Les fractions BMC-47F5 et F6 sont les actifs (**C5**).

Tube	Fraction	Poids [mg]
18	BMC-47F1	-
19	BMC-47F2	0.6
20	BMC-47F3	1.3
21	BMC-47F4	1.9
22	BMC-47F5 (C5)	1.6
23	BMC-47F6 (C5)	0.6
24	BMC-47F7	-
25	BMC-47F8	-
26	BMC-47F9	-

TABLEAU # 49. Résumé des fractions provenant de la purification en HPLC [MeOH-H₂O:TFA 0.1% (80:20)] de BMC-32F5.

B.Travaux réalisés sur Rumex obtusifolius (Polygonaceae)

L'extrait éthanolique a été évaporé à sec (1.1 g) et soumis à une séparation chromatographique liquide sous vide (VLC) en utilisant de la silice en phase normale (5.0 cm x ø 7 cm). On a collecté des fractions de 100 ml pour obtenir 112 fractions qui ont été regroupées en 16 fractions. Les Tableaux # 50 y 51 présentent respectivement les rendements des fractions obtenues et les résultats des tests biologiques sur FBIT des dites fractions,.

TUBE	ELUTION*	UNION	FRACTION	POIDS [mg]	% RENDEMENT
1- 4	EP	1- 12	RO- 10V1	23,2	2.1
5- 8	DM- EP (2%)				
9- 12	DM- EP (5%)				
13- 16	DM- EP (10%)	13- 21	RO- 10V2	106.9	9.7
17- 20	DM- EP (15%)				
21- 24	DM- EP (20%)	22- 27	RO- 10V3	18,2	1.7
25- 28	DM- EP (25%)				
29- 32	DM- EP (30%)	28- 35	RO- 10V4	93.4	8.5
33- 36	DM- EP (35%)	36- 39	RO- 10V5	19.1	1.7
37- 40	DM- EP (40%)	40- 49	RO- 10V6	15.9	1.4
41- 44	DM- EP (45%)				
45- 48	DM- EP (50%)				

*M: MeOH, DM: CH₂Cl₂

**TABLEAU # 50. Suite. Fractions provenant de la séparation par VLC de
Rumex obtusifolius.**

TUBE	ELUTION*	UNION	FRACTION	POIDS [mg]	% RENDEMENT
49- 52	DM- EP (55%)	50- 60	RO- 10V7	11.3	1.0
53- 56	DM- EP (60%)				
57- 60	DM- EP (65%)				
61- 64	DM- EP (70%)	61- 65	RO- 10V8	26.9	2.4
65- 68	DM- EP (75%)	66-70	RO- 10V9	44.8	4.1
69- 72	DM- EP (80%)	71	RO- 10V10	3.0	0.3
73- 76	DM- EP (85%)	72- 80	RO- 10V11	34.5	3.1
77- 80	DM- EP (90%)				
81- 84	DM- EP (95%)	81- 85	RO- 10V12	29.1	2.6

**TABLEAU # 50. Suite. Fractions provenant de la séparation par VLC de
Rumex obtusifolius.**

TUBE	ELUTION *	UNION	FRACTION	POIDS [mg]	% RENDEMENT
85- 88	DM (100%)	86- 92	RO- 10V13	55.9	5.1
89- 92	M- DM (2%)				
93- 96	M- DM (5%)	93- 100	RO- 10V14	103.7	9.4
97- 100	M- DM (10%)				
101- 104	M- DM (15%)	101- 108	RO- 10V15	121.2	11.0
105- 108	M- DM (20%)				
109- 112	M- DM (25%)	109- 112	RO- 10V16	148.1	13.5

*M: MeOH, DM: CH₂Cl₂, EP: Ether de pétrole.

TABLEAU # 50. Suite. Fractions provenant de la séparation par VLC de *Rumex obtusifolius*.

FRACTION	% Inhibition [2.5 mg/ml]	% Inhibition [1.25 mg/ml]	% Inhibition [0.25 mg/ml]
RO- 10V1	52	24	5
RO- 10V2	50	47	11
RO- 10V3	5	1	0
RO- 10V4	26	0	0
RO- 10V5	16	0	11
RO- 10V6	11	0	0
RO- 10V7	53	48	32
RO- 10V8	56	57	54
RO- 10V9	61	62	58
RO- 10V10	53	50	24
RO- 10V11	53	37	0
RO- 10V12	50	44	41
RO- 10V13	46	47	40
RO- 10V14	42	35	32
RO- 10V15	0	0	0
RO- 10V16	0	18	0

TABLEAU # 51. Résultats de FBIT des fractions provenant de la séparation par VLC de *Rumex obtusifolius*.

La fraction RO-10V8 y RO-10V9 ont été réunies sous la dénomination RO-21U1 (71.7 mg) pour continuer la purification du ou des composants actifs. Pour cette étape de la purification, nous avons utilisé une colonne de gel de silice ouverte (4 g SiO₂, 17 x ø 1 cm) éluée avec du dichlorométhane . On a collecté des fractions de 2- 3 ml pour arriver à un total de 170 fractions qui ont été regroupées pour donner 11 fractions. Le Tableau # 52 présente le bilan des fractions obtenues grâce à cette chromatographie ouverte tandis que le Tableau # 53 présente les résultats des tests FBIT. La fraction active (S8), qui présente une seule tache en CCM, a été recristallisée dans du méthanol pour obtenir ainsi des cristaux de couleur orange sous forme d'aiguilles très fines. Le Tableau # 54 présente les résultats de FBIT des cristaux purs à 0.25, 0.125 et 0.0625 mg/ml. Il est important de noter que la CI₅₀ de ces cristaux est de

0.071 mg/ml, une valeur comparable à celle enregistrée par la chloroquine (0.016 mg/ml) dans ce même essai.

UNION	FRACTION	POIDS [mg]	% RENDEMENT
1- 16	RO- 34S1	0.5	0.7
17- 35	RO- 34S2	1.1	1.5
36- 49	RO- 34S3	4.2	5.9
50- 61	RO- 34S4	2.0	2.8
62- 69	RO- 34S5	10.3	14.4
96- 108	RO- 34S6	4.3	6.0
109- 115	RO- 34S7	2.7	3.8
116- 151	RO- 34S8	13.2	18.4
152- 160	RO- 34S9	4.1	5.7
161-166	RO- 34S10	8.4	11.7
167-170	RO- 34S11	7.2	10.0

TABLEAU # 52. Fractions provenant de la séparation par chromatographie avec la colonne ouverte de RO-21U1.

FRACTION	% Inhibition [1.25 mg/ml]	% Inhibition [0.25 mg/ml]	% Inhibition [0.125 mg/ml]
RO- 34S1	P.T	34	0
RO- 34S2	12	0	0
RO- 34S3	18	0	0
RO- 34S4	42	6	0
RO- 34S5	12	45	0
RO- 34S6	55	53	42
RO- 34S7	65	62	60
RO- 34S8	83	75	75
RO- 34S9	57	56	53
RO- 34S10	44	22	0
RO- 34S11	35	43	9

TABLEAU # 53. Résultats du test FBIT des fractions provenant de la séparation par chromatographie avec la colonne ouverte de RO-21U1.

Nom	% Inhibition [0.25 mg/ml]	% Inhibition [0.125 mg/ml]	% Inhibition [0.0625 mg/ml]
RO- 8Vc (C6)	80	86	42

TABLEAU # 54. Résultats du test FBIT des cristaux RO-8Vc (C6).

C.Travaux sur Gustavia augusta (Lecythidaceae)

Quatre grammes de l'extrait chloroformique des graines de la plante ont été soumis à une séparation par VLC (5 x 10 cm, 150 gr de SiO₂). On a recueilli des fractions de 150 à 200 ml jusqu'à obtenir 49 fractions lesquelles ont été unies pour obtenir 15 fractions par similitudes en CCM. Chacune des fractions résultantes a été soumise à l'essai FBIT à 2.5, 1.25 et 0.25 mg/ml. Le Tableau # 55 présente le rendement du fractionnement et le Tableau # 56 les résultats des essais FBIT sur les fractions obtenues.

TUBE	ELUTION*	UNION	FRACTION	POID [mg]	% RENDEMENT
1- 7	M- DM (1%)	1- 6	GGC-19V1	42.3	1.1
8- 11	M- DM (3%)	7- 10	GGC-19V2	19.6	0.5
12- 18	M- DM (5%)	11- 13	GGC-19V3	121.6	3.0
	M- DM (5%)	14	GGC-19V4	26.9	0.7
	M- DM (5%)	15- 16	GGC-19V5	44.8	1.1
	M- DM (5%)	17	GGC-19V6	13	0.3
19- 23	M- DM (7%)	18- 21	GGC-19V7	54.5	1.4
24- 28	M- DM (10%)	22- 24	GGC-19V8	13.2	0.3
	M- DM (10%)	25- 28	GGC-19V9	39.1	1.0
29- 31	M- DM (15%)	29	GGC-19V10	5.9	0.1
32- 34	M- DM (20%)	30- 38	GGC-19V11	213.7	5.3
35- 37	M- DM (25%)				
38- 40	M- DM (30%)	39- 41	GGC-19V12	362.2	9.1
41- 43	M- DM (35%)	42	GGC-19V13	68.6	1.7
44	M- DM (45%)	44- 46	GGC-19V14	81.1	2.0
45- 49	M- DM (60%)	47- 49	GGC-19V15	335.2	8.4

*M: MeOH, DM: CH₂Cl₂

TABLEAU # 55. Fractions provenant de la séparation par VLC de *Gustavia augusta*.

FRACTION	% Inhibition [2.5 mg/ml]	% Inhibition [1.25 mg/ml]	% Inhibition [0.25 mg/ml]
GGC-19V1	49	50	9
GGC-19V2	48	44	28
GGC-19V3	91	85	68
GGC-19V4	0	0	13
GGC-19V5	86	90	45
GGC-19V6	38	42	29
GGC-19V7	85	20	36
GGC-19V8	7	18	-
GGC-19V9	26	13	-
GGC-19V10	26	22	28
GGC-19V11	0	0	0
GGC-19V12	11	0	17
GGC-19V13	54	17	0
GGC-19V14	88	51	3
GGC-19V15	13	0	0

TABLEAU # 56. Résultats de FBIT des fractions provenant de la séparation par VLC de *Gustavia augusta*.

La fraction GGC-19V3 a été postérieurement soumise à une colonne FLASH de silice (28.8 x 1.2 cm, 400 mg). Le Tableau # 57 présente le résumé de la purification et le Tableau # 58 les résultats des tests FBIT.

TUBE	ELUTION*	UNION	FRACTION	POID [mg]	% RENDEMENT
1- 130	DM	1- 22	GGC-33CS0	-	-
		23- 38	GGC-33CS1	0.4	0.3
		39- 43	GGC-33CS2	0.7	0.6
		44- 75	GGC-33CS3	3.5	3.0
		76- 130	GGC-33CS4	5.3	4.4
131- 150	M:DM (3%)	131- 137	GGC-33CS5	1.5	1.2
		138- 141	GGC-33CS6	36.9	30.5
		142- 144	GGC-33CS7	11.8	9.8
151- 168	M:DM (10%)	145- 162	GGC-33CS8	32.4	26.7
		163- 168	GGC-33CS9	7.2	6.0

*M: MeOH, DM: CH₂Cl₂

TABLEAU # 57. Fractions provenant de la purification par chromatographie FLASH de la fraction GGC-19V3.

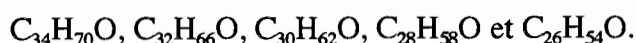
FRACTION	% Inhibition [0.25 mg/ml]	% Inhibition. [0.125 mg/ml]
GGC-33CS0	PT	PT
GGC-33CS1	0	PT
GGC-33CS2	59	29
GGC-33CS3 (C7)	75	44
GGC-33CS4	35	0
GGC-33CS5	26	0
GGC-33CS6	21	0
GGC-33CS7	0	0
GGC-33CS8	0	0

TABLEAU # 58. Résultats des tests FBIT des fractions provenant de la chromatographie Flash de la fraction GGC- 19V3.

4. Caractéristiques des composés obtenus des plantes étudiées

A. Composé C1: alcools gras

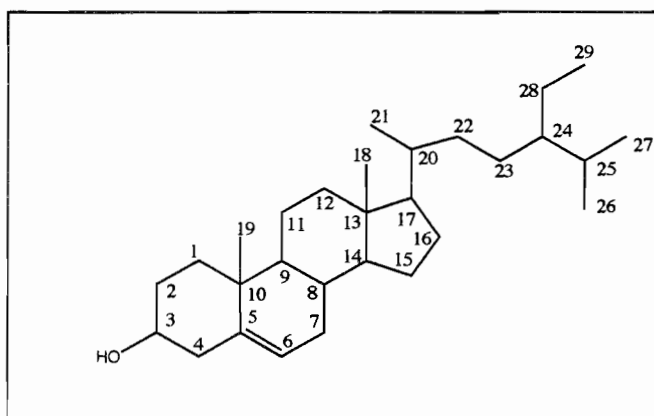
Le composé C1 est un mélange d'alcools gras:



Masse (DCI/NH₃): m/z (rel. Int.): 512 (22.0), 484 (76.2), 456 (100), 428 (22.4).

¹H-RMN (CDCl₃, 250 MHz): 3.6 ppm (2H), 1.6 ppm (2H), 1.3 ppm (67 H), 0.9 ppm (3H).

B. Composé C2: β - sitostérol



Formule brute: C₂₉H₅₀O

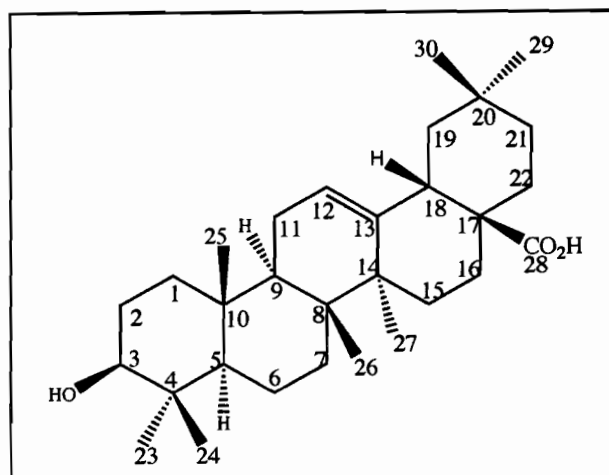
Pf: 137°C

Masse (DCI/NH₃): m/z (rel. Int.): 432 (100.0), 414 (70.7), 397 (85.4), 303 (6.4), 208 (8.9), 180 (38.2)

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. Int.): 414 [M]⁺ (100.0), 396 (36.4), 381 (20.5), 329 (27.3), 303 (25.0), 273 (9.1), 255 (9.1), 231 (6.8), 213 (13.6), 159 (20.5), 119 (34.1), 107 (50.0).

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) et ¹³C-RMN (CDCl₃, 400 MHz): Tableau # 18.

C.Composé C3: acide oléanolique



Formule brute: $C_{30}H_{48}O_3$

Pf: 306°C

$[\alpha]_D^{25} = +75^\circ$ ($CHCl_3$; c 0.1)

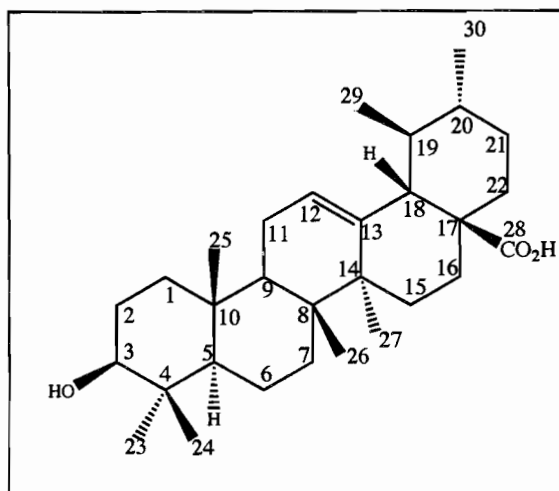
IR $\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} : 3450 (OH), 2940 (CH), 2857 (CH), 1694 (CO), 1463 (CH_3 , CH_2), 1385 (OH), 604 (O-C=O).

Masse (DCI/ NH_3): m/z (rel. Int.): 474 (100.0), 439 (5.0), 248 (5.2), 216 (7.2), 207 (2.1).

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. Int.): 248 (100.0), 203 (44), 189 (12.1), 149 (26.2), 127 (18.0).

1H -RMN ($CDCl_3$, 500 MHz) et ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 500 MHz): Tableau # 22.

C.Composé C4: acide ursolique



Formule brute: $C_{30}H_{48}O_3$

Pf: 290°C

$[\alpha]_D^{25} = +73^\circ$ ($CHCl_3$; c 0.1)

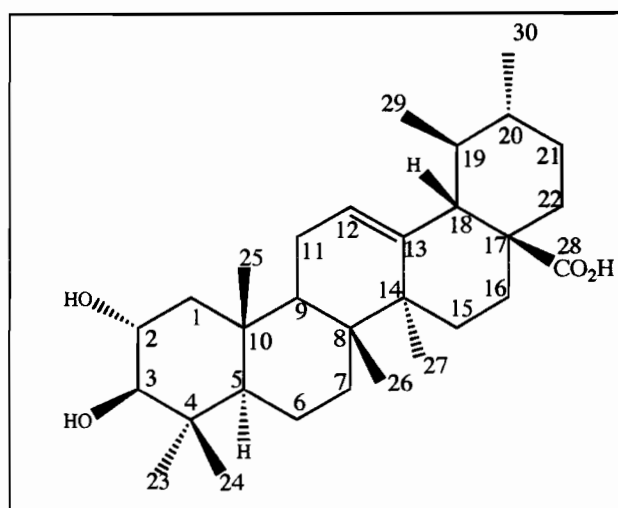
IR $\nu_{max}^{CHCl_3} \text{ cm}^{-1}$: 3420 (OH), 2966 (CH), 2871 (CH), 1693 (CO), 1456 (CH_3 , CH_2), 1387 (OH), 1029 (O-C=O).

Masse (DCI/ NH_3): m/z (rel. Int.): 474 (100.0), 457 (17.1), 439 (5.7), 248 (5.3).

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. Int.): 456 (3.1), 248 (100.0), 207 (14.2), 203 (15.1), 189 (5.1).

1H -RMN ($CDCl_3$ - CD_3OD , 500 MHz) et ^{13}C -RMN ($CDCl_3$ - CD_3OD , 500 MHz): Tableau # 23.

D.Composé C5: acide corosolique



Formule brute: $C_{30}H_{48}O_4$

$[\alpha]_D^{25} = +25^\circ$ ($CHCl_3$; c 0.1)

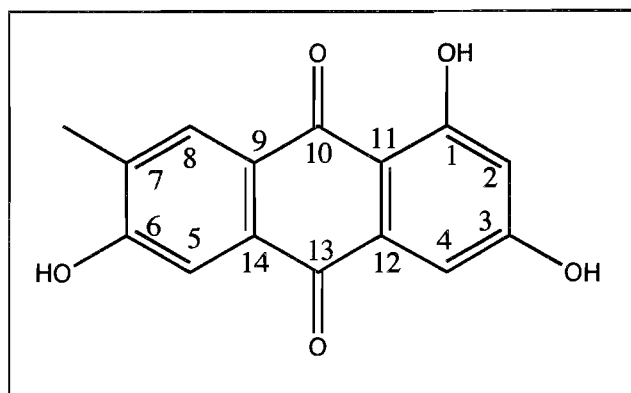
IR $\nu_{max}^{CHCl_3} \text{ cm}^{-1}$: 3414 (OH), 2928 (CH), 2859 (CH), 1690 (CO), 1457 (CH_3 , CH_2), 1384 (OH), 617 (O-C=O).

Masse (DCI/ NH_3): m/z (rel. Int.): 490 (100.0), 473 (8.6), 455 (5.3), 446 (30.6), 248 (3.6).

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. Int.): 248 (100.0), 203 (15.1), 189 (5.1).

1H -RMN ($CDCl_3$ - CD_3OD , 500 MHz) et ^{13}C -RMN ($CDCl_3$ - CD_3OD , 500 MHz): Tableau # 27.

E. Composé C6: déméthylmacrosporine I



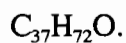
Formule brute: $C_{15}H_{10}O_5$

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. Int.): 270 (100.0), 242 (6.4), 241 (8.2), 214 (4.5), 213 (8.8), 185 (4.0), 167 (6.8), 149 (14.9), 139 (12.6), 128 (8.1), 84 (6.6), 69 (15.1), 57 (10.5), 43 (10.3).

1H -RMN ($CDCl_3$ - CD_3OD , 500 MHz) et ^{13}C -RMN ($CDCl_3$ - CD_3OD , 500 MHz): Tableau # 31.

F. Composé C7: alcool gras

Le composé C7 est l'alcool gras:

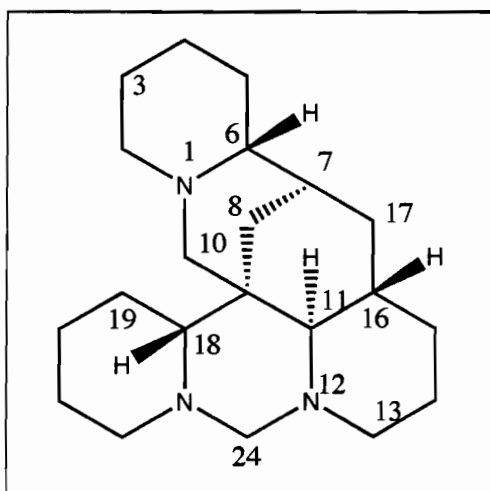


Masse (DCI/ NH_3): m/z: 549.

Masse (IE) 70 eV: m/z: 531, 516

^1H -RMN (CDCl_3 , 250 MHz): 5.1 ppm, 3.5 ppm, 1.3 ppm, 0.85 ppm.

G. Composé C8: homoormosanine

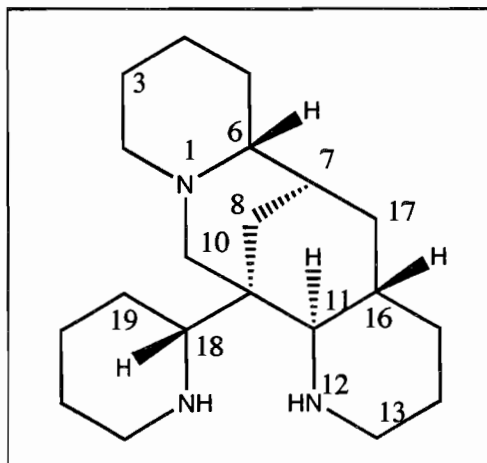


Formule brute: $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_3$

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. Int.): 329 (94), 247 (9), 246 (35), 233 (11), 232 (12), 231 (38), 217 (6), 205 (4), 164 (9), 163 (15), 162 (11), 150 (15), 149 (15), 148 (17), 136 (13), 134 (13), 123 (11), 122 (9), 110 (16).

^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) et ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 500 MHz): Tableau # 35.

H.Composé C9: ormosanine



Formule brute: $C_{20}H_{35}N_3$

Masse (IE) 70 eV: m/z (rel. Int.): 317 (36), 234 (14), 233 (7), 219 (18), 191 (7), 151 (15), 149 (3).

1H -RMN ($CDCl_3$, 500 MHz) et ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 500 MHz): Tableau # 35.

REFERENCES

- Addae- Kyereme, J.; Croft, S.L.; Kendrick, H.; Wright, C.W. "Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; *in vivo* antimalarial activity of pleiocarpine". *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, 76, 99- 103.
- Ang, H.H.; Chan, K.L.; Mak, J.W. "*In vitro* antimalarial activity of quassinoids from *Eurycoma longifolia* against Malaysian chloroquine- resistant *Plasmodium falciparum* isolates". *Planta Medica* **1995**, 61, 177- 178.
- Antoun, M.K.; Gerena, L.; Milhous, W.K. "Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactives" *International Journal of Pharmacognosy* **1993**, 4, 255- 258.
- Araya-Maturana, R.; Delgado-Castro, T.; Cardona, W.; Weiss-López, B.E. "Use of long-range C-H ($^1J_{n>3}$) heteronuclear multiple bond connectivity in the assignment of the ^{13}C NMR spectra of complex organic molecules". *Current Organic Chemistry* **2001**, 5, 253- 263.
- Atamna, H.; Krugliak, M.; Shalmie, G.; Deharo, E.; Pescarmona, G.; Ginsburg, H. "Mode of antimalarial effects of methylene blue and some of its analogues on *Plasmodium falciparum* in culture and their inhibition of *Plasmodium venckei petteri* and *Plasmodium yoelli nigeriensis in vivo*". *Biochemical Pharmacology* **1996**, 51, 693-700.
- Atamna, H.; Ginsburg, H. " Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*". *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, 61, 231-241.
- Bahl, A.; Brunks, B.; Coppel, R.L.; Crabtree, J.; Diskin, S.J.; Fraunholz, M.J.; Grant, G.R.; Gupta, D.; Huestis, R.L.; Kissinger, J.C.; Labo, P.; Li, L.; McWeeney, S.K.; Milgram, A.J.; Roos, D.S.; Schug, J.; Stoeckert Jr., C.J. "PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. An integrated database providing tools for accessing, analyzing and mapping expression and sequence data (both finished and unfinished)". *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 87- 90.
- Baelmans, R.; Deharo, E.; Bourdy, G.; Muñoz, V.; Quenevo, C.; Sauvain, M.; Ginsburg, H. "A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test

- pertinent for the detection of antimalarial natural products?”. *Journal of Ethnopharmacology* **2000** (73), 271- 275.
- Banco Agrario del Peru. Universidad Nacional de Trujillo. Junio **1988**, pp 54.
- Barton, D.H.R.; Cheung, H.T.; Daniels, P.J.L.; Lewis, K.G.; McGhie, J.F. “Triterpenoids. Part XXVI. The triterpenoids of *Vangueria tomentosa*”. *Journal of the Chemical Society Abstracts* **1962**, 5163- 5175.
- Basilico, N.; Monti, D.; Oliaro, P.; Taramelli, D. “ Non- iron porphyrins inhibit β -haematin (malaria pigment) polymerization”. *FEBS Letters* **1997**, 409, 297- 299.
- Bauch, H-J.; Labadie, R.P.; Leistner, E. “Biosynthesis of Nepodin (2- acetyl-3-methylnaphthalene- 1,8- diol) in *Rumex alpinus* L.” *Journal of Chemical Science Perkin I* **1975**, 689- 692.
- Baudoin, M. *Historia natural de un valle de los Andes, La Paz*. Ed. Instituto de Ecología UMSA, **1991**.
- Berzabih, M.; Abegaz, B.M.; Dufall, K.; Croft, K.; Skinner- Adams, T.; Davis, T.M. “Antiplasmodial and antioxidant isofuranonaphthoquinones from the roots of *Bulbine capitata*”. *Planta Medica* **2001**, 67, 340- 344.
- Bhandari, S.P.S.; Garg, H.S.; Agrawal, P.K.; Bhakuni, D.S. “Ursane triterpenoids from *Nepeta eriostachia*”. *Phytochemistry* **1990**, 29, 3956- 3958.
- Bickii, J.; Njifutie, N.; Foyere, J.A.; Basco, L.K.; Ringwald, P. “*In vitro* antimalarial activity of limonoids from *Khaya grandifoliola* C.D.C (Meliaceae)”. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, 69, 27- 33.
- Bohle, S.D.; Dinnebier, R.E.; Madsen, S.K.; Stephens, P.W. “Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X- Ray diffraction”. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 713- 716.
- Bravo, J.A.; Lavaud, C.; Bourdy, G.; Deharo, E.; Gimenez, A.; Sauvain, M. “Antimalarial activity of ormosanine and homoomosanine from *Bowdichia virgiloides*”. *Revista Boliviana de Química* **2002a**, 19, 12- 17.
- Bravo, J.A.; Lavaud, C.; Bourdy, G.; Gimenez, A.; Sauvain, M. “First bioguided phytochemical approach to *Cavanillesia aff. hylogeiton*”. *Revista Boliviana de Química* **2002b**, 19, 18- 24.
- Bringmann, G.; Menche, D.; Bezabih, M.; Abegaz, B.M.; Kaminsky, R. “Antiplasmodial activity of knipholone and related natural phenylantraquinones”. *Planta Medica* **1999**, 65, 757- 758.

- Bringmann, G.; Saeb, W.; Assi, L.A.; Narayanan, A.S.S.; Peters, K.; Peters, E.M. "Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of benzyl ester". *Planta Medica* **1997**, 63, 255- 257.
- Budzikiewicz, H.; Wilson, J.M.; Djerassi, C. "Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes". *Journal of the American Chemical Society* **1985**, 85, 3688- 3699.
- Cabrera, A.L. *Flora de la provincia de Buenos Aires*. Colección Científica del I;N;T;A, Buenos Aires , **1967**.
- Calas, M.; Ancelin, M.L.; Cordina, G.; Portefaix, P.; Piquet, V.; Vidal- Sailhan, V.; Vial, H. "Antimalarial activity of compounds interfering with *Plasmodium falciparum* phospholipid metabolism: comparison between mono- and bisquaternary ammonium salts". *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 505- 516.
- Caniato, R.; Puricelli, L. "Review: Natural antimalarial agents (1995- 2001)". *Critical Reviews in Plant Sciences* **2003**, 22, (1), 79- 105.
- Chou, A.C.; Fitch, C.D. "Control of heme polymerase by chloroquine and other quinoline derivatives". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 915, 422- 427.
- Chou, A.C.; Fitch, C.D. "Heme polymerase: modulation by chloroquine treatment of a rodent malaria". *Life Science* **1992**, 51, 2073- 2078.
- Cimanga, K.; De Bruyne, T.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J. "In vitro and in vivo antiplasmodial activity of cryptolepine and related alkaloids from *Cryptolepis sanguinolenta*". *Journal of Natural Products* **1997**, 60, 688- 691.
- Constantinidis, I.; Satterlee, J.D. " UV- Visible and carbon NMR studies of quinine binding to urohemin I chloride and uroporphyrin I in aqueous solution". *J. Am. Chem. Soc.* **1988a**, 110, 927- 932.
- Constantinidis, I.; Satterlee, J.D. " UV- Visible and carbon NMR studies of chloroquine binding to urohemin I chloride and uroporphyrin I in aqueous solution". *J. Am. Chem. Soc.* **1988b**, 110, 4391- 4395.
- Cronquis, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. The New York Botanical Garden, Columbia University Press, New York, **1981**.

- Cunha, W.R.; Martins, C.; da Silva Ferreira, D.; Miller Crotti, A.E.; Lopes, N.; Albuquerque, S. “*In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia species*”. *Planta Medica* **2003**, 69, 468- 470.
- Curtis, J.; Duraisingh, M.T.; Warhurst, D.C. “*In vivo* selection for a specific genotype of dihydropteroate synthetase of *Plasmodium falciparum* by pyrimethamine-sulfadoxine but not chlorproguanil-dapsone treatment”. *Journal of Infectious Disease*. **1998**, 177, 1429- 1433.
- Deharo, E.; García, R.N.; Oporto, P.; Gimenez, A.; Sauvain, M.; Julian, V.; Ginsburg, H. “A non- radiolabelled ferriprotoporphyrin IX biomineralisation inhibition test for the high throughput screening of antimalarial compounds”. *Experimental Parasitology* **2002**, 100, 252-256.
- Deharo, E.; Bourdy, G.; Quenevo, C.; Muñoz, V.; Ruiz, G.; Sauvain, M. “A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana indians”. *Journal of Ethnopharmacology* **2001** (77), 91-98.
- Deharo, E.; Gautret, Ph.; Muñoz, V.; Sauvain, M. “ Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimalaricas”. CYTED- IRD. 2000.
- Deharo, E.; Sauvain, M.; Moretti, C.; Richard, B.; Ruiz, E.; Massiot, G. “ Activité antipaludique du n- hentriacontanol isolé de *cuatresia* sp. (*Solanaceae*)”. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **1992** (67), 126-127.
- Demirezer, Ö.; Kuruüzüm, A.; Bergere, I. “Five naphthalene glycosides from the roots of *Rumex patientia*”. *Phytochemistry* **2001**, 56, 399- 402.
- Demirezer, L.Ö.; Kuruüzüm, A. “A comparative chemotaxonomic study on eleven *Rumex* species growing in Turkey. FABAD”. *Journal of Pharmaceutical Science* **1997**, 22, 153- 158.
- De Souza, A.D.L.; Da Rocha, A.F.I.; Pinheiro, M.L.B.; Andrade, C.H.; Galotta, A.L.Q.; dos Santos, M.P.S. “Chemical constituents of *Gustavia augusta* L. (*Lecythidaceae*)”. *Quimica nova* **2001**, 24, 439- 442.
- Dimitry, M.J. *Enciclopedia Argentina de agricultura y jardineria*. Editorial ACME, S.A.C.I. Buenos Aires, **1980**.
- Dorn, A.; Vippaguna, S.R.; Matile, H.; Bubendorf, A.; Vennerstrom, J.L.; Ridley, R.G. “A comparison and analysis of several ways to promote heamatins (haem)

- polymerization and an assessment of its initiation *in vitro*". *Biochemical Pharmacology* **1998**, *55*, 737- 747.
- Dorn, A.; Stoffel, R. Matile, H.; Bubendorf, A.; Ridley, R.G. "Malarial haemozoin/ β -haematin supports hem polymerization in the absence of protein". *Nature*, **1995**, *374*, 269- 271.
- Dou, J.; McChesney, J.D.; Sindelar, R.D.; Goins, D.K.; Walker, L.A. " A new quassinoid from *Castela texana*" *Journal of Natural Products* **1996**, *59*, 73- 76.
- Egan, T.J. "Quinoline antimalarials". *Exp. Opin. Ther. patents* **2001**, *11*, 185- 209.
- Egan, T.J.; Hempelmann, E.; Mavuso, W.W. "Characterisation of synthetic β - haematin and effects of the antimalarial drugs quinidine, halofantrine, desbutylhalofantrine and mefloquine on its formation". *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999**, *73*, 101- 107.
- Egan, T.J.; Ross, D.C.; Adams, P.A. "Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of β - haematin (malaria pigment)". *FEBS Letters* **1994**, *352*, 54-57.
- Fandeur, T.; Moretti, C.; Polonsky, J. "*In vitro* and *in vivo* assessment of the antimalarial activity of sergeolide". *Planta Medica* **1985**, *1*, 20- 23.
- Fassil, Y.; Bezabeh, A.; Abegaz, B.; Botta, B.; Delle Monache, G.; Delle Monache, F. "Anthracene derivatives from *Rumex abyssinicus*" *Journal of Natural Products* **1985**, *48*, 148.
- Federici, E.; Palazzino, G.; Nicoletti, M.; Galeffi, C. "Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaefolia*". *Planta Medica* **2000**, *66*, 93- 95.
- Fitch, C.D.; Kanjanangulpan, P. "The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment". *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 15552- 15555.
- Fidock, D.A.; Rosenthal, P.J.; Croft, S.L.; Brun, R.; Nwaka, S. "Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening" *Nature reviews*, **2004**, *3*, 509- 520.
- Fournet, A., Muñoz, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., Gantier, J-C. "Antiprotozoal activity of dehydrozaluzanin C, a sesquiterpene lactone isolated from *Munnozia maronii* (Asteraceae)". *Phytotherapy Research* **1993**, *7*, 111-115.
- François, G.; Diakanamwa, C.; Timperman, G.; Bringmann, G.; Steenackers, T.; Atassi, G.; Van Looveren, M.; Holenz, J.; Tassin, J.P.; Aké Assi, L.; Vanhaelen-Fastré, R.; Vanhaelen, M. "Antimalarial and cytotoxic potencial of four quassinoids from *Hannoa chloranta* and *Hannoa klaineana*, and their structure- activity relationships". *International journal of Parasitology* **1998**, *28*, 635- 640.

- François, G.; Timperman, G.; Eling, W.; Aké Assi, L.; Holenz, J.; Bringmann, G. "Naphthylisoquinoline alkaloids against malaria: evaluation of the curative potenzials of dioncophylline C and dioncophylline A against *Plasmodium berghei* in vivo". *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **1997**, 41, 2533- 2539.
- François, G.; Passreiter, C.M.; Woerdenbag, H.J.; Van Looveren, M. "Antiplasmodial activities and cytotoxic effects of aqueous extracts and sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*". *Planta Medica* **1996**, 62, 126- 129.
- François, G.; Bringmann, G.; Schneider, H.; Timperman, G.; Aké Assi, L. "Activities of extracts and naphthylisoquinoline alkaloid from *Triphyophyllum peltatum*, *Ancistrocladus abbreviatus* and *Ancistrocladus barteri* against *Plasmodium berghei* (Anka strain) in vitro". *Journal Ethnopharmacology* **1995**, 46, 115- 120.
- Frédérich, M.; Hayette, M.P.; Tits, M.; de Mol, P.; Angenot, L. "Reversal of chloroquine and mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* by the two monoindole alkaloids, incajine and isoretuline". *Planta Medica* **2001**, 67, 523- 527.
- Fry, M.; Pudney, M. "Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1, 4-naphthoquinone (566C80)". *Biochemical Pharmacology* **1992**, 43, 1545- 1553.
- Garcia Barriga, H. *Flora medicinal de Colombia*. Tomos I, II. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional Bogota D.E. Colombia, **1975**.
- Girault, L. *Kallawaya. Guérisseurs itinérants des Andes*. Ed. de l'ORSTOM- Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération. Paris, **1984**.
- Gluzman, I.Y.; Francis, S.E.; Oksman, A.; Smith, C.E.; Duffin, K.L.; Goldberg, D.E. "Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway". *Journal of Clinical Investigation* **1994**, 93, 1602- 1608.
- Goldberg, D.E. "Hemoglobin degradation in *Plasmodium* infected red blood cell". *Seminars in Cell Biology* **1993**, 4, 355- 361.
- Goldberg, D.E.; Slater, A.F.G.; Cerami, A.; Henderson, G.B. "Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in an unique organelle". *Proceedings of the National Academy of Science USA* **1990**, 87, 2931- 2935.
- Green, M.D.; Xiao, L.; Lal, A.A. "Formation of hydroxyeicosatetraenoic acids from hemozoin- catalyzed oxidation of arachidonic acid". *Molecular and Biochemical Parasitology* **1996**, 83, (2), 183- 188.

- Greenwood, B & Mutabingwa, T. "Malaria in 2002". *Nature* **2002**, 415, 670- 679.
- Grellier, P.; Ramiamanana, L.; Millerioux, V.; Deharo, E.; Schrével, J.; Frappier, F.; Trigalo, F.; Bodo, B.; Pousset, J.L. "Antimalarial activity of cryptolepine and isocryptolepine, alkaloids isolated from *Cryptolepis sanguinolenta*". *Phytotherapy Research* **1996**, 10, 317- 321.
- Gunatilaka, A.A.L.; Berger, J.M.; Evan, R.; Miller, J.S.; Wisse J.H.; Neddermann, K.M.; Bursuker, I.; Kingston, D.G.I. "Isolation, synthesis and structure- activity relationships of bioactive benzoquinones from *Miconia lepdota* from Suriname rainforest". *Journal of Natural Products* **2001**, 64, 2- 5.
- Harborne, J.B.; Mokhtari, N. "Two sulphated anthraquinone derivatives in *Rumex pulcher*" *Phytochemistry* **1977**, 16, 1314- 1315.
- Hasan, A.; Ahmed, I.; Jay, M.; Voirin, B. "Flavonoid glycosides and an anthraquinone from *Rumex chalepensis*". *Phytochemistry*, **1995**, 39, 1211- 1213.
- Haslett, B.G.; Bailey, C.J.; Ramshaw, J.A.M.; Scawen, M.D.; Boulter, D. "The amino acid sequence of plastocyanin from *Rumex obtusifolius*". *Phytochemistry* **1978**, 17, 615- 617.
- Hasrat, J.A.; de Backer, J.P.; Valquelin, A.J. "Medicinal plants in Suriname: screening of plants extracts for receptobinding activity". *Phytomedicine* **1997**, 4, 56- 65.
- Hawley, S.R.; Bray, P.G.; Mungthin, M.; Atkinson, J.D.; O'Neil, P.M.; Ward, S.A. "Relationship between antimalarial drug activity, accumulation, and inhibition of heme polymerization in *Plasmodium falciparum* in vitro". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, 42 (3), 682- 691.
- Heath, R.J.; White, S.W.; Rock, C.O. "Inhibitors of fatty acid synthesis as antimicrobial chemotherapeutics" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 58, 695- 703.
- Heywood, J.H. *Flowering plants of the world*. Oxford University press. Oxford, London, Melbourne, **1978**.
- Hong, Y.L.; Yang, Y.Z.; Meshnick, S. "The interaction of artemisinin with malarial hemozoin". *Mol. Biochem. Parasitol.* **1994**, 63, (1), 121- 128.
- Hosoe, T.; Nozawa, K.; Udagawa, S-I.; Nakajima, S.; Kawai, K-I. "An anthraquinone derivative from *Dichotomophthora lutea*". *Phytochemistry* **1990**, 29, 997- 999.
- Ignatushchenko, M.V.; Winter, R.W.; Bachinger, H.P.; Hinrichs, D.J.; Riscoe, M.K. "Xanthenes as antimalarials agents, studies of a possible mode of action". *FEBS Letters* **1997**, 409, 67- 73.

- Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Turbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H.K.; Soldati, D.; Beck, E. "Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs" *Science* **1999**, 285, 1573- 1576.
- Kasai, T.; Okuda, M.; Sakamura, S. "6-O-malonyl- β -methyl-D-glucopyranoside from roots of *Rumex obtusifolius*". *Phytochemistry* **1981**, 20, 1131- 1132.
- Khalid, S.A.; Friedrichsen, G.M.; Kharazmi, A.; Theander, T.G.; Olsen, C.E.; Brøgger C.S. "Limonoids from *Khaya senegalensis*" *Phytochemistry* **1998**, 49, 1769- 1772.
- Kirby, G.C.; Paine, A.; Warhurst, D.C.; Noamese, B.K.; Phillipson, J.D. "*In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of cryptolepine, a plant- derivated indoloquinoline". *Phytotherapy Research* **1995**, 9, 359- 363.
- Kitagawa, I.; Mahmud, T.; Yokota, K.; Nakagawa, S.; Mayumi, T.; Kobayashi, M.; Shibuya, H. "Indonesian medicinal plants. XVII. Characterization of quassinoids from the stems of *Quassia indica*". *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **1996**, 44, 2009- 2014.
- Köhler, S.; Delwiche, C.F.; Denny, P.W.; Tilney, L.G.; Webster, P.; Wilson, R.J.; Palmer, J.D.; Roos, D.S. "A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites". *Science* **1997**, 275, 1485- 1489.
- Köhler, I.; Jenett- Siems, K.; Mockenhaupt, F.P.; Siems, K.; Jakupovic, J.; Gonzalez, J.C.; Hernandez, M.A.; Ibarra, R.A.; Berendsohn, W.G.; Bienzle, U.; Eich, E. "*In vitro* antiplasmodial activity of 4- phenylcoumarins from *Exostema mexicanum*". *Planta Medica* **2001**, 67, 89- 91.
- Lee, CH-K. "Ursane triterpenoids from leaves of *Melaleuca leucadendron*" *Phytochemistry* **1998**, 49, 1119- 1122.
- Leonardi, E.; Gilvary, G.; White, N.J.; Nosten, F. "Severe allergic reactions to oral artesunate: a report of two cases". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2001**, 95, 182- 183.
- Likhitwitayawuid, K.; Kaewamatawong, R. Ruangrunsi, N.; Krungkrai, J. "Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*". *Planta Medica* **1998a**, 64, 237- 241.
- Likhitwitayawuid, K.; Phadungcharoen, T.; Krungkrai, J. "Antimalarial xanthenes from *Garcinia cowa*". *Planta Medica* **1998b**, 64, 70- 72.

- Lin, A.J.; Zikry, A.B.; Kyle, D.E. "Antimalarial activity of new dihydroartemisinin derivatives. 7 4-(p-substituted phenyl)-4(R or S)-[10(alpha or beta)-dihydro-artemisininoxy] butyric acids". *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, 40, 1396- 1400.
- Looareesuwan, S.; Chulay, J.D.; Canfield, C.J.; Hutchinson, D.B.A. "Malarone® (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone clinical trials study group". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, 60, 533- 541.
- MacKinnon, S.; Dust, T.; Arnason, J.T.; Angerhofer, C.; Pezzuto, J.; Sanchez- Vindas, P.E.; Poveda, L.J.; Gbeassor, M. "Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives". *Journal of Natural Products* **1997**, 60, 336- 341.
- Mann, J. *Secondary metabolism*. Oxford Science Publications, second edition. Oxford, New York, Toronto, Dehli, Bombay, Calcuta, Madras, Karachi, Petaling, Jaya, Singapore, Hong Kong, Tokyo, Nairobi, Dar es Salaam, Cape Town, Melbourne, Auckland, Berlin, Ibadan, **1992**.
- Marinho, L.C.; Carneiro da Cunha, M.T.M.; Thomas, G.; Barbosa-Filho, J.M. "Constituents of *Bowdichia virgilioides*". *Fitoterapia* **1994**, 5, 475.
- Mendez, V. *El problema de Malaria en Bolivia*. Ministerio de Previsión Social y Salud Pública. La Paz, **1982**.
- Mendez, V. *El problema de Malaria en Bolivia*. Ministerio de Previsión Social y Salud Pública. La Paz, **1981**.
- Ministerio de Previsión Social y Salud Pública de Bolivia. *Informe epidemiológico sobre paludismo. Oficina central de malaria*. La Paz, **1992**.
- Midiwo, J.O.; Rukunga, G.M. "Distribution of anthraquinone pigments in *Rumex* species of Kenya". *Phytochemistry* **1985**, 24, 1390- 1391.
- Monti, D.; Vodopivec, B.; Basilico, N.; Oliaro, P.; Taramelli, D. "A novel endogenous antimalarial: Fe(II)-protoporphyrin IX α (Heme) inhibits hematin polymerization to β -hematin (malaria pigment) and kills malaria parasites". *Biochemistry* **1999**, 38, 8858- 8862.
- Muhammad, I.; Dunbar, C.D.; Takamatsu, S.; Walker, L.A.; Clark, A.M. "Antimalarial, citotoxic, and antifungal alkaloids from *Duguetia hadrantha*". *Journal of Natural Products* **2001**, 64, 559- 562.
- Munavu, R.M.; Mudamba, L.O.; Ogur, J.A. "Isolation and characterization of the major anthraquinone pigments from *Rumex abyssinica*" *Planta Medica* **1984**, 50, 111.

- Muñoz, V.; Sauvain, M.; Bourdy, G.; Callapa, J.; Bergeron, S.; Rojas, I.; Bravo, J.A.; Balderrama, L.; Ortiz, B.; Gimenez, A.; Deharo, E. "A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians". *Journal of ethnopharmacology* **2000**, 69, 127-137.
- Muñoz, V.; Sauvain, M.; Mollinedo, P.; Callapa, J.; Rojas, L.; Giménez, A.; Valentin, A.; Mallié, M. "Antimalarial activity and cytotoxicity of (-)- roemrefidine isolated from the stem bark of *Sparattanthelium amazonum*". *Planta Medica* **1999**, 65, 448-449.
- Newton, P.; White, N. "Malaria: new developments in treatment and prevention". *Annual Review of Medicine* **1999**, 50, 179- 192.
- Oketch- Rabah, H.A.; Lemmich, E.; Dossaji, S.F.; Theander, T.G.; Olsen, C.E.; Cornett, C.; Kharazmi, A.; Brøgger Christensen, S. "Two new antiprotozoal 5-methylcoumarins from *Vernonia brachycalyx*". *Journal of Natural Products* **1997**, 60, 458- 461.
- Olliaro, P.L.; Goldberg, D.E. "The plasmodium digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target". *Paristology Today* **1995**, 11, (8), 294- 297.
- O'Neil, P.M.; Miller, A.; Bishop, L.P.; Hindley, S.; Maggs, J.L.; Ward, S.A.; Roberts, S.M.; Scheinmann, F.; Stachulski, A.V.; Posner, G.H.; Park, B.K. "Synthesis, antimalarial activity, biomimetic iron(II) chemistry, and *in vivo* metabolism of novel, potent C-10-phenoxy derivatives of dihydroartemisinin". *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 44, 58- 68.
- Ortuño, T.; "Estudio palinológico en un gradiente altitudinal en el valle de Zongo. La Paz- Bolivia". Tesis para optar el título de licenciatura en Biología, UMSA, **2000**.
- Pagola, S.; Stephens, P.W.; Bohle, D.S.; Kosar, A.D.; Madsen, S.K. "The structure of malaria pigment β - haematin". *Nature* **2000**, 404 (16), 307-310.
- Paulo, A.; Gomes, E.T.; Steele, J.; Warhurst, D.C.; Houghton, P.J. "Antiplasmodial activity of *Cryptolepis sanguinolenta* alkaloids from leaves and roots". *Planta Medica* **2000**, 66, 30- 34.
- Pérez, H.; Diaz, F.; Medina, J.D. "Chemical investigation and *in vitro* antimalarial activity of *Tabebuia ochracea* ssp. *neochrysantha*". *International Journal of Pharmacognosy* **1997**, 35, 227- 231.

- Pettit, G.R.; Zhang, Q.; Pinilla, V.; Herald, D.L.; Doubek, D.L.; Duke, J.A. "Isolation and structure of Gustastatin from the brazilian nut tree *Gustavia hexapetala*". *Journal of Natural Products* **2004**, 67, 983- 985.
- Polhill, R.M.; Raven, P.H. *Advances in legumine systematics*. Parts I and II. Royal Botanical Garden, Kew, Richmond, Surrey, England, **1981**.
- Portela, C.; Afonso, C.M.M.; Pinto, M.M.M.; Ramos, M.J. "Definition of an electronic profile of compounds with inhibitory activity against hematin aggregation in malaria parasite". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12, 3313- 3321.
- Price, R.N. "Artemisinin drugs: novel antimalarial agents". *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, 9, 1815- 1827.
- Ralph, S.A.; D'Ombrain, M.C.; McFadden, G.I. "The apicoplast as an antimalarial drug target". *Drug Resist. Updates*. **2001**, 4, 145- 151.
- Ramanitrahasimbola, D.; Rasoanaivo, P.; Ratsimamanga- Urveg, S.; Federici, E.; Palazzino, G.; Galeffi, C.; Nicoletti, M. "Biological activities of plant- derived bisindole voacamine with reference to malaria". *Phytotherapy Research* **2001**, 15, 30- 33.
- Rasoanaivo, P.; Ratsimamanga- Urveg, S.; Rafatro, H.; Ramanitrahasimbola, D.; Palazzino, G.; Galeffi, C.; Nicoletti, M. "Alkaloids of *Hernandia voyronii*: chloroquine- potentiating activity and structure elucidation of herveline D". *Planta Medica* **1998**, 64, 58- 62.
- Ridley, R.G. "Medical needs, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs". *Nature* **2002**, 415, 686- 693.
- Ridley, R.G.; Dorn, A.; Vippagunta, S.R.; Vennerstrom, J.L. "Haematin (haem) polymerization and its inhibition by quinoline antimalarials". *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **1997**, 91, (5), 559- 566.
- Ridley, R.G.; Hofheinz, W.; Matile, H.; Jaquet, C.; Dorn, A.; Masciadri, R.; Jolidon, S.; Richter, W.F.; Guenzi, A.; Girometta, M.A.; Urwyler, H.; Huber, W.; Thaithong, S.; Peters, W. "4- amino quinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine- resistant *Plasmodium falciparum*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1996**, 40, 1846- 1854.
- Sauvain, M.; Moretti, C.; Bravo, J.A.; Muñoz, V.; Ruiz, E.; Richard, B.; Le Men- Olivier, L. "Antimalarial activity of alkaloids from *Pogonopus tubulosus*". *Phytotherapy research* **1996**, 10, 198- 201.

- Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. "Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18α - oleic acid, ursolic acid and their 11- oxo derivatives". *Magnetic Resonance in Chemistry* **2003**, 41, 636- 638.
- Sharma, M.; Sharma, P.; Rangaswami, S. "Orientalone a new 1, 4- napthoquinone from *Rumex orientalis*". *Indian Journal of Chemistry* **1977**, 544- 545.
- Sherman, I.W.A. *Brief History of Malaria and Discovery of the Parasite's Life cycle. Malaria: Parasitology Biology, Patogénesis and Protection*. 1st Ed. Washington, D.C. 1998.
- Sittie, A.A.; Lemmich, E.; Olsen, C.E.; Hyiid, L.; Brøgger Christensen, S. "Alkamides from *Phyllanthus fraternus*" *Planta Medica* **1998**, 64, 192- 193.
- Slater, A. F. "Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*". *Pharmacology & Therapeutics* **1993**, 57, 230- 235.
- Slater, A.F.G.; Swiggard, W.J.; Orton, B.R.; Flitter, W.D.; Goldberg, D.E.; Cerami, A.; Henderson, G.B. "An iron- carboxylate bond links the heme units of malaria pigment". *Procedings of the National Academy of Science USA* **1991**, 88, 325- 329.
- SNIS. Servicio Nacional de Informes Sanitarios. Ministerio de Previsión Social y Salud Pública (1980- 2005). La Paz, **2005**.
- Solis, P.N.; Lang'at, C.; Gupta, M.P.; Kirby, G.C.; Warhurst, D.C.; Phillipson, J.D. "Bio-active compounds from *Psychotria componutans*" *Planta Medica* **1995**, 61, 62- 65.
- Solomón, J. S. (M.O.).; Expédition personnel, cahiers de terrain, Bolivia; **1981- 1988**.
- Steele, J.C.P.; Warhurst, D.C.; Kirby, G.C.; Simmonds, M.S.J. "In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial". *Phytotherapy Research* **1999**, 13, 115- 119.
- Sullivan, D.J.; Matile, H.; Ridley, R.G.; Goldberg, D.E. " A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines". *The Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273 (47), 31103-31107.
- Sullivan, D.J.Jr; Gluzman, I.Y; Goldberg, D.E. "Plasmodium hemozoin formation mediated by hystidine- rich proteins". *Science* **1996a**, 271, (5246), 219- 222.
- Sullivan, D.J.; Gluzman, I.Y.; Russel, D.G.; Goldberg, D.E. "On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action". *Procedings of the National Academy of Science USA* **1996b**, 93, (21), 11865- 11870.

- Suri, J.L.; Dhar, K.L.; Atal, C.K. "Chemical constituents of *Rumex orientalis* Bernh." *Journal of Indian Chemical Society* **1978**, 55, 292- 293.
- Takaya, Y.; Tasaka, H.; Chiba, T.; Uwai, K.; Tanitsu, M.; Kim, H.; Wataya, Y.; Miura, M.; Takeshita, M.; Oshima, Y. "New type of febrifugine analogues, bearing a quinolizidine moiety, show potent antimalarial activity against *Plasmodium malaria* parasite". *Journal of Medical Chemistry* **1999**, 42, 3163- 3166.
- Takaya, Y.; Kurumada, K.; Takeuji, Y.; Kim, H.S.; Shibata, Y.; Ikemoto, N.; Wataya, Y.; Oshima, Y. "Novel antimalarial guaiane- type sesquiterpenoids from *Nardostachys chinensis* roots". *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 1361- 1364.
- Tori, K.; Seo, S.; Shimaoka, A.; Tomita, Y. *Tetrahedron letters* **1974**, 4227.
- Torrenegra, R.; Bauereiß, P.; Achenbach, H. "Homoommosanine type alkaloids from *Bowdichia virgiloides*". *Phytochemistry* **1989**, 28, 2219- 2221.
- Torrenegra, R.G.; Escarria, S.R.; Bauereiß, P.; Achenbach, H. "Homoommosanine, the major alkaloid of the bark from *Bowdichia virgiloides*". *Planta Medica* **1985**, 276- 277.
- Trager, W.; Jensen, J.B. "Human malaria parasites in continuous culture". *Science* **1976**, 193, 673- 675.
- Traore- Keita, F.; Faure, R.; Ollivier, E.; Gasquet, M.; Azas, N.; Debrauwer, L.; Keita, A.; Timon- David, P.; Balansard, G. "Structure and antiprotozoal activity of triterpenoid saponines from *Glinus oppositifolius*". *Planta Medica* **2000**, 66, 368- 371.
- Vennerstrom, J.L.; Makler, M.T.; Angerhofer, C.K.; Williams, J.A. "Antimalarial dyes revisited: xanthenes, azines, oxazines, and thiazines". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, 39, 2671- 2677.
- Waller, R.F.; Keeling, P.J.; Donald, R.G.; Striepen, B.; Handman, E.; Lang- Unnasch, N.; Cowman, A.F.; Besra, G.S.; Roos, D.S.; McFadden, G.I. "Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*". *Proceedings of the National Academy of Science USA* **1998**, 95, 12352- 12357.
- Waikédré, J. "Alcaloïdes de *Bowdichia virgilioides*". **2000**, Rapport de DEA.
- Wiesner, J.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. "New antimalarial drugs". *Angewandte Chemie. Int. Ed.* **2003**, 42, 5274- 5293.

- Wiesner, J.; Henschker, D.; Hutchinson, D.B.; Beck, E.; Jomaa, H. “*In vitro* and *in vivo* synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug with clindamycin”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, 46, 2889- 2894.
- Winstanley, P. “Chlorproguanil-dapsone (LAPDAP) for uncomplicated *falciparum malaria*”. *Trop. Med. Int. Health* **2001**, 6, 952- 954.
- Winter, R.W.; Cornell, K.A.; Johnson, L.L.; Ignatushchenko, M.; Hinrichs, D.J. Riscoe, M.K. “Potentiation of the antimalarial agent rufigallol”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1996**, 40, (6), 1408- 1411.
- Zalles, J.; de Lucca, M. *El verdde de la salud*. Cooperación técnica alemana. Servicio integrado en salud. Programa de las Naciones Unidas para la infancia- Bolivia. Ministerio de previsión social y salud pública- Bolivia. 2^{nda} Ed. Cochabamba, **1993**.
- Ziegler, J.; Linck, R.; Wright, D.W. “Heme aggregation inhibitors: Antimalarial drugs targeting an essential biomineralization process”. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, 8, 171-189.

ADDENDUM

“APPLICATION DU TEST DE L’INHIBITION DE LA BIOCRISTALLISATION DE L’HEME A LA CARACTERISATION DE COMPOSES ANTIPALUDIQUES ISOLES DE LA FLORE DE BOLIVIE”

Par
Sandra IBAÑEZ- CALERO

Pagé 194. A mettre sous le tableau 37: Nous proposons que le comportement électronique du chlorure d’hémine se rapproche de celui du μ -oxo-dimère proposé par PORTELA.

La présence du chlore comme contre-ion du Fe 3+ porté par le noyau tétra-pyrrolique pourrait avoir comme conséquence une charge résultante négative au niveau du Fe et permettre ainsi l’assemblage préférentiel des inhibiteurs sur le chlorure d’hémine empêchant la formation du dimère de β -hématine. Pour confirmer cette hypothèse, il reste à faire le calcul théorique de cette répartition des charges sur le chlorure d’hémine.

Dans les paragraphes suivants, nous montrons comment les composés inhibiteurs de l’essai FBIT pourrait former un complexe avec le chlorure d’hémine en partant de l’hypothèse précédente de la répartition des charges sur le chlorure d’hémine

Tableaux # 2- #5 (p. 15-27), les résultats de CI_{50} contre *P. falciparum* de certain composés sont présentés en ng/ml ou μ g/ml; ces concentrations sont présentées en μ M dans le tableau suivant.

COMPOSE	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- sensible, CI_{50}	<i>P. falciparum</i> , souche Chloroquino- résistante, CI_{50}
Cryptolepine HCl	0.15 μ M	0.23 μ M, 0.19 μ M
11- Hydroxycryptolepine	0.13 μ M	0.18 μ M, 0.24 μ M
Quindoline	0.30 μ M	0.40 μ M, 0.50 μ M
Neocryptolepine	0.15 μ M	0.22 μ M, 0.28 μ M
Voacamine	0.34 μ M	0.41 μ M
Vobassine	1.34 μ M	2.32 μ M
Coronaridine	1.47 μ M	0.82 μ M
Imbiline- I	0.17 μ M	0.86 μ M
Dioncopeltine A	0.055 μ M	
Dioncophylline A	3.83 μ M	
Dioncophylline B	0.62 μ M	
Benz(g)isoquinoléine- 5, 10 dione		4.02 μ M
Tubulosine	0.013 μ M	0.023 μ M
Psychotrine	0.30 μ M	0.84 μ M
Cephaléine	0.059 μ M	0.024 μ M
1- Hydroxybenzoiso- chromanquinone		11.47 μ M
Acide bétulinique	56.80 μ M, 22.94 μ M	42.98 μ M
Acide ursolique	33.16 μ M	39.69 μ M
Gédunine	0.081 μ M	0.041 μ M, 2.59 μ M
Méthylangolensate		11.47 μ M
6- Méthylhydroxy- angolensate		44.98 μ M
7- Déacetylkhivorin		9.34 μ M
1- Déacetylkhivorin		17.70 μ M
Glaucarubolone	0.32 μ M	0.51 μ M
Holacanthone	0.023 μ M	0.028 μ M
Chaparrinone	0.66 μ M, 0.098 μ M	0.53 μ M
Exomexine A	132 μ M	52.55 μ M
Exomexine B	117.73 μ M	40.70 μ M
Cowanol	3.24 μ M	
Cowaxanthone	3.66 μ M	
B- Mangostin	7.32 μ M	

Les résultats de CI_{50} contre **FBIT** des composés isolés sont présentés en mg/ml, ensuite ces concentrations sont présentées en μ M. β - sitosterol: 483 μ M, acide oleanolique: 417 μ M; acide ursolique: 3508 μ M, acide corosolique: 424 μ M, Démethylmacrosporine I: 263 μ M, Homoormosanine: 304 μ M, Ormosanine: 568 μ M et chloroquine: 93.9 μ M.

ERRATUM

“APPLICATION DU TEST DE L’INHIBITION DE LA BIOCRISTALLISATION DE L’HEME A LA CARACTERISATION DE COMPOSES ANTIPALUDIQUES ISOLES DE LA FLORE DE BOLIVIE”

Par

Sandra IBAÑEZ- CALERO

Pagé 3: "Le malades présentent une température élevée et constante " doit être remplacé par "Les malades présentent une fièvre en plateau".

Tableau # 2 (p. 15): "Cryptopteine HCl" doit être remplacé par: " Cryptolepine HCl "

Pagé 33: "Une des étapes de cette transformation est l'oxydation du Fe^{+2} en Fe^{+3} avec la génération d'un électron libre". doit être remplacé par: "Une des étapes de cette transformation est l'oxydation du Fe^{+2} en Fe^{+3} avec la génération d'un électron".

Pagés 51 et 52: "Ce type de composés est représenté par l'artémisinine (22) [Hong et al. 1994], le bleu de méthylène (30)...." doit être remplacé par: "Ce type de composés est représenté par le bleu de méthylène (30)....".

Tableaux # 10- 12 (p. 78- 88): "FBIT, % inh. à 10 mg/ml" doit être remplacé par: "FBIT, % inh. à 2.5 mg/ml"

Tableau # 13 (p. 91): "FBIT, % inh. à 10 mg/ml" doit être remplacé par: "FBIT, % inh. à 2.5 mg/ml"

Tableau # 16 (p. 114), 1ère ligne: corrélation en J^2 entre H-18 et C-4 doit être remplacé par corrélation en J^2 entre H-18 et C-13.

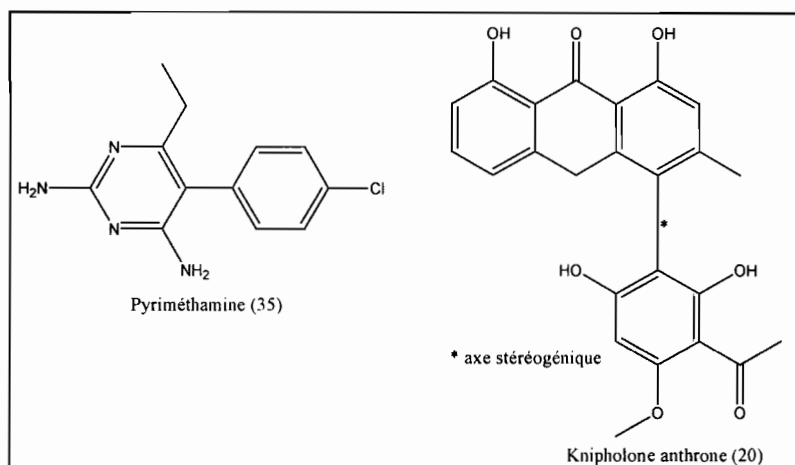
Tableau # 24 (p. 142), 3ème ligne: pas de corrélation en J^4 entre C-21 et H-21. 12ème ligne: corrélation en J^2 entre H-5 et C-11 doit être remplacé par corrélation en J^4 entre H-5 et C-11.

Tableau # 32 (p. 171), le déplacements chimiques dans les colonnes 3 à 5 correspond aux carbones pas aux protons. Dans la dernière ligne: corrélation en J^3 entre H-5 et C-10 doit être remplacé par corrélation en J^4 entre H-5 et C-10.

Pagé 19. Il manque la structure de la knipholone anthrone (20).

Pagé 30 La structure de la pyriméthamine (35) est incorrecte.

Les structures correctes de ces 2 molécules sont les suivantes:



Pagé 204: "Une de ces espèces, *Liabum hastifolium* (Loranthaceae)..." doit être remplacé par: "Une de ces espèces, *Liabum hastifolium* (Compositae)..."

Figure # 49 (p. 211). *Picrolemno* doit être remplacé par *Pricolemna*.

Figure # 50 (p. 212). La structure correcte de le sérgeolide est présente dans la Figure # 21 (p. 103).

Résumé - Summary

La vallée du Zongo située au nord de la ville de La Paz en Bolivie, est une vallée tropicale transandine d'altitude présentant une importante diversité végétale. Dans le cadre d'une recherche de nouveaux composés antipaludiques, cinquante-huit plantes caractéristiques de la flore de cet endroit ont été soumises à l'essai d'inhibition de biocrystallisation de la ferriprotoporphyrine IX (FBIT) pour évaluer leur capacité à empêcher la formation d'hémozoïne plasmodiale. Des 134 extraits testés, 14 espèces se sont montrées actives. L'essai *in vitro* sur la schizogonie érythrocytaire de *Plasmodium falciparum* a amené à confirmer l'intérêt pharmacologique de 4 espèces : *Brachyotum microdon* (Melastomaceae), *Miconia boliviensis* (Melastomaceae), *Gaiadendron punctatum* (Loranthaceae) et *Liabum hastifolium* (Asteraceae). Des séparations phytochimiques bioguidées de *B. microdon* ont été conduites en utilisant le test FBIT. Deux types de composés actifs ont été obtenus : des alcools gras et des triterpènes. Les triterpènes caractérisés, l'acide oléanolique, l'acide ursolique et l'acide corosolique, sont responsables de l'inhibition de la biocrystallisation de l'hème. Les triterpènes ont également présenté une activité modérée contre *Plasmodium falciparum*. Des études complémentaires d'espèces médicinales amazoniennes ont été également conduites. De *R. obtusifolius*, une anthraquinone active contre FBIT, la déméthylmacrosporine I a été caractérisée. L'étude des écorces de tronc de *Bowdichia virgiloides* (Leguminosae) a permis la caractérisation d'alkaloïdes du type ormosia présentant une importante activité antiplasmodiale et également sur FBIT. La séparation phytochimique bioguidée de *Gustavia augusta* (Lecythidaceae) utilisant le test FBIT a permis la caractérisation d'alcool gras bioactifs.

Mots clefs: Inhibition de la biocrystallisation de la ferriprotoporphyrine (FBIT), antipaludique, *Plasmodium falciparum*, *Brachyotum microdon*, *Rumex obtusifolius*, *Bowdichia virgiloides*, *Gustavia augusta*, acide corosolique, déméthylmacrosporine, alcaloïdes du type ormosia, alcool gras, Bolivie.

The Zongo Valley located North from the city of La Paz, Bolivia is a tropical, trans-Andean, high valley with important plant diversity. In regard to the research on new antimalarial compounds, fifty-eight plants characteristic of this area were tested on the inhibition of the formation of hemozoin, a malaria pigment. Out of 134-essayed extracts, 14 species showed activity. *In vitro* assays with erythrocytary schizogony of *Plasmodium falciparum* led to confirm the pharmacological interest on four species: *Brachyotum microdon* (Melastomataceae), *Miconia boliviensis* (Melastomataceae), *Gaiadendron punctatum* (Loranthaceae) y *Liabum hastifolium* (Asteraceae). The phytochemistry guided separation of *Brachyotum microdon* were carried out using the FBIT test (Ferriprotoporphyrin IX or hem biocrystallization test). Two types of active compounds were obtained: fatty alcohols and triterpens. The triterpens, oleanolic acid, ursolic acid and corosolic acid are responsible for the inhibition of hem biocrystallization. Similarly, the triterpens present moderate activity against *Plasmodium falciparum*. Complementary studies on Amazon medical species were similarly developed. From *Rumex obtusifolius* (Polygonaceae), an antraquinone active against FBIT; déméthylmacrosporine I was characterized. Studies on the bark of *Bowdichia virgiloides* (Leguminosae) allowed the elucidation of alkaloids of the ormosia type that showed an important antiplamodical activity and similarly against FBIT. The phytochemistry bioguided separations of *Gustavia augusta* (Lecythidaceae) using FBIT assay allowed the characterization of active fatty alcohol.

Key words: Ferriprotoporphyrin IX biocrystallization inhibition test (FBIT), antimalarial, *Plasmodium falciparum*, *Brachyotum microdon*, *Rumex obtusifolius*, *Bowdichia virgiloides*, *Gustavia augusta*, corosolic acid, demethylmacrosporin, alkaloids of the ormosia type, fatty alcohol, Bolivia.