

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National Polytechnique de Toulouse

Ecole doctorale : **Sciences de la Matière**

Spécialité : **Chimie – Biologie – Santé**

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2007 par

Ivone Lucia ACEBEY CASTELLON

Caractérisation de terpènes antileishmaniens isolés par bioguidage d'une plante bolivienne

***Hedyosmum angustifolium* (Ruiz & Pavon) Solms**

Co - Directeurs de thèse : Professeur Claude MOULIS

Docteur Michel SAUVAIN

JURY

Pr. R. MARTINO	Professeur de l'Université de Toulouse III	Président
Pr. L. PIETERS	Professeur de l'Université d'Anvers	Rapporteur
Pr. P. RICHOMME	Professeur de l'Université d'Angers	Rapporteur
Pr. P. LOISEAU	Professeur de l'Université Paris-Sud XI	Examineur
Dr. V. JULLIAN	Charge de Recherche à l'IRD	Examineur
Pr. C. MOULIS	Professeur de l'Université de Toulouse III	Directeur de thèse
Dr. M. SAUVAIN	Directeur de Recherche à l'IRD	Directeur de thèse

Caractérisation de terpènes antileishmaniens isolés par bioguidage d'une plante bolivienne
***Hedyosmum angustifolium* (Ruiz & Pavon) Solms – Chloranthaceae**

Afin de trouver de nouvelles molécules d'origine naturelle efficaces contre la leishmaniose, et de valoriser la biodiversité bolivienne, nous avons travaillé sur une plante issue du Parc National de Cotapata en Bolivie. Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle des écorces de *H. angustifolium*. Au cours de ce travail nous avons isolé 7 molécules dont 4 sont nouvelles (**M2**, **M4**, **M5** et **M6**) et présentent des structures originales, notamment les deux isomères bolivianine (**M5**) et isobolivianine (**M6**). Ces deux composés appartiennent à la famille des sesterpènes et sont décrits pour la première fois. Les résultats de test biologiques de ces 7 molécules montrent que : l'onosériolide (**M1**) est le plus actif sur les amastigotes axéniques de *L. amazonensis* et *L. infantum*. De plus, il garde l'activité sur les amastigotes intramacrophagiques. Le spathuléol (**M7**) est lui particulièrement actif sur les macrophages infectés et il est de plus faiblement cytotoxique.

Characterisation of antileishmanial terpenes from a Bolivian plant, *Hedyosmum angustifolium* (Ruiz & Pavon) Solms – Chloranthaceae

In a way to find new natural treatments for leishmaniasis, and to promote Bolivian biodiversity, we worked on a plant from the National Park of Cotapata, Bolivia. The aim of this work is the phytochemical study of the ethyl acetate extracts of *H. angustifolium*'s bark. We have successfully isolated and characterized 7 molecules (**M2**, **M4**, **M5** and **M6**) with 4 new original structures. The two isomers bolivianine (**M5**) and isobolivianine (**M6**) are new sesterpenes reported for the first time. Biological activities of the molecules showed that onoseriolide (**M1**) was very active against axenic amastigotes from *L. amazonensis* and *L. infantum*. Moreover, it was still active on the intramacrophagic amastigotes. Spathulenol (**M7**) was active against intramacrophagic amastigotes and also appeared to be weakly cytotoxic.

Remerciements

Le travail de recherche présenté ici a été réalisé grâce à des nombreuses collaborations et se situe à l'interface entre la chimie et la biologie. Je ne saurais oublier les personnes qui ont aidé et soutenue cette thèse.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire UMR 152 IRD UPS – Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox à la Faculté de Pharmacie de Toulouse, dirigée par Mme le Professeur François NEPVEU. Je tiens à la remercier pour m'avoir chaleureusement accueilli au sein de l'équipe de recherche ainsi que pour sa confiance lors de ces années en France.

Je tiens aussi à remercier à l'équipe de l'Institut de Recherche Pharmaco Biochimique (IIFB) de l'Université Mayor de San Andrés à La Paz, dirigé par le Docteur Alberto GIMENEZ, pour la confiance qu'ils m'ont fait en soutenant mon projet de formation à l'étranger. Ainsi que à l'ensemble de l'équipe de l'Herbier National de Bolivie, dirigé par le Docteur Stephan Beck.

Je remercie l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) qui a financée ces trois années de travail. Ainsi que la Dirección General de la Biodiversité (DGB), pour avoir autorisé l'accès et la récolte des espèces au sein du Parc National Protégé de Cotapata, Dispositif de Tunquini.

Je remercie aussi Monsieur le Docteur Michel SAUVAIN pour m'avoir proposé ce sujet de thèse très original qui fait partie d'un projet interinstitutionnel en vue de « valoriser la flore bolivienne », ainsi que pour son soutien et ses conseils au long de ces années. Un merci au Professeur Claude MOULIS pour avoir accepté d'être co-directeur de thèse ainsi que pour son soutien et sa confiance.

Mes remerciements vont également à M le Professeur Robert MARTINO de l'Université de Toulouse III pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse malgré ses multiples obligations.

Je souhaite remercier M le Professeur Luc PIETERS de l'Université d'Anvers et M le Professeur Pascal RICHOMME de l'Université d'Angers, deux grands spécialistes des substances naturelles, pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs et de participer à mon jury de thèse et surtout pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce manuscrit ainsi que pour les nombreux commentaires formulés lors de ma soutenance de thèse.

J'adresse également mes remerciements à M le Professeur Philippe LOISEAU de l'Université de Paris-Sud XI, pour avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse et pour ses remarques avisées lors de ma soutenance de thèse.

Je souhaite remercier M le Docteur Jean VACHER, représentant de l'IRD en Bolivie, pour son intérêt, son soutien et sa confiance envers les étudiants du pays du tiers monde.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Mlle Valérie JULLIAN, pour m'avoir initié dans l'immense champ de c'est qui est « la chimie ». Merci pour nos discussions, ainsi que pour sa présence au long de ces trois années, sa disponibilité et son amitié.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance aux personnes avec lesquelles j'ai eu le plaisir de travailler durant ces années, en particulier Alexis VALENTIN, je le remercie pour son soutien, sa confiance, ses conseils et son amitié ainsi qu'à Denis SERENO pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de l'Unité de Recherche UR 008 à Montpellier, pour ses enseignements qui m'ont permis d'obtenir et approfondir les résultats biologiques. Je remercie aussi Grace RUIZ du laboratoire de La Paz pour son amitié et les encouragements qu'elle a su me donner.

Je tiens à remercier plus particulièrement Bénédicte PORTET et Séverine MAUREL pour leur amitié, leur soutien, leur présence et pour les discussions scientifiques pertinentes et enrichissantes que nous avons eu et qui m'ont beaucoup aidé au long de ces trois années.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail :

Nicolas FABRE et Pierre PERIO pour la réalisation des nombreux spectres de masse. Je remercie l'ensemble de l'équipe de recherche UMR 152 pour leur sympathie et leur expérience : Marie Carmen MONJE, Karine REYBIER, Cécile DEBITUS, Dominique LAURENT, Jalloul BOUJILLA, Dominique BRUEL, Eric DEHARO, Geneviève BOURDY. Merci aussi à tous mes collègues et amis du laboratoire qui ont su « chauffer » l'ambiance et que j'ai eu la chance de côtoyer : Sothea, Hani, Clotilde, Luc, Billy, Valérie, Fathia, Lise, Anne Cécile, Francianne, Colin, Igor, Edouard, Yannick, Mohamed, Vincent, Agnès, Amélie. Une pensée particulière à ceux qui m'ont intégré au laboratoire à Montpellier : Elodie, Bruno, Batiste et Déborah.

Je remercie grandement mes amis pour leur soutien qui fut très importante pour moi : Susana, Andrea, Giovanni, Rachel, Viviana, Fabien, Fred, Julien et Marie.

Une pensée très spéciale pour ma famille qui m'a toujours encouragée, ils ont toujours été là pour moi sans faille, je les remercie de tout mon cœur. Ainsi qu'un grand merci à la famille BIJEIRE pour leur soutien qui a été si précieuse pour moi. Enfin, je remercie de toutes mes forces Laurent pour sa bonne humeur, son soutien et son aide surtout en ceux moments où j'ai senti que je n'y arriverais pas. Enfin je dédie cette thèse à ma mère parce qu'elle est toujours avec moi.

Que ceux qui ne sont pas nommés ici me pardonnent, s'ils ont été oubliés, ce n'est que par l'écrit.....

Abréviations

Abréviations

(1), (2), (3) etc bibliographique.	: Désignation des composés mentionnés dans la synthèse
$[\alpha]_D$: Pouvoir rotatoire
AcOEt	: Acétate d'éthyle
APCI	: Ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric pressure chemical ionization)
APG	: Angiosperm phylogeny group
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ASE	: Automatic sampler extractor
ATP	: Adenin triphosphate
CCM	: Chromatographie sur couche mince
$CDCl_3$: Chloroforme deutéré
CH_2Cl_2	: Dichlorométhane
CLHP	: Chromatographie liquide haute performance
CI_{50}	: Concentration Inhibitrice à 50%, concentration nécessaire pour avoir 50% d'inhibition de croissance du parasite
C_6D_6	: Benzène deutéré
COSY	: COrelated Spectroscopy
CPC	: Chromatographie de partage centrifuge
CQ	: Chloroquine
δ_C	: Déplacement chimique du carbone
δ_H	: Déplacement chimique du proton
DMEM	: Dubelcco's modified eagle's medium
<i>d</i>	: doublet
<i>de</i>	: doublet élargi
<i>dd</i>	: doublet dédoublé
<i>ddd</i>	: doublet dédoublé dédoublé
<i>ddt</i>	: doublet dédoublé détriplé
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay.
ESI	: Ionisation par électrospray (electrospray ionization).
FPP	: Farnésylpyrophosphate

H ₂ O	: Eau distillée
Hela	: Human cervical squamous carcinoma cell
HIV	: Human immunodeficiency virus.
HMBC	: Heteronuclear multiple bond correlation.
HRMS	: Spectrométrie de masse haute résolution (high resolution mass spectrometry)
HSQC	: Heteronuclear single quantum coherence
Hz	: Hertz
IFAT	: Immunofluorescence
IL'12	: Interleukine 12
INF- γ	: Interféron gamma
IR	: Infra rouge
IS	: Index de sélectivité (IS = CI ₅₀ Cellule/CI ₅₀ parasites)
<i>J</i>	: Constante de couplage
LC/MS	: Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (liquid chromatography/mass spectrometry)
LC	: Leishmaniose cutanée
LCM	: Leishmaniose mucocutanée
LCD	: Leishmaniose cutanée diffuse
LV	: Leishmaniose viscérale
<i>m</i>	: multiplet
M1, M2, etc	: Désignations des composés isolés dans le présent travail
<i>m/z</i>	: rapport masse/charge atomique
MeOH	: Méthanol
MIC	: Concentration inhibitrice minimal
MCF-7	: Lignées de cellules mammaires cancéreuses humaines
MPLC	: Chromatographie liquide moyenne pression (medium pressure liquid chromatography)
MTT	: Sel de tetrazolium [3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)].
NNN	: Novy-mcNeal-nicolle
NO	: Monoxyde d'azote
NOESY	: Nuclear overhauser enhancement spectroscopy
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
<i>ppm</i>	: partie par millions
Q-TOF	: spectrométrie hybride quadripôles temps de vol (quadrupole time of flight)
PCR	: Polymérisation en chaîne

RDA	: Rétro Diels-Alder
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
RMN ¹ H	: Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³ C	: Résonance magnétique nucléaire du carbone
RMN ¹³ C (<i>Jmod</i>)	: Résonance magnétique nucléaire du carbone en mode <i>J</i> modulé
<i>s</i>	: singulet
<i>se</i>	: Singulet élargi
SDS	: Dodecyl sulphate de sodium
SI	: indice de survie des cellules
SiO ₂	: Silice
SM	: Spectrometry de masse
<i>sp</i>	: Espèces
SPE	: Solid Phase Extraction
<i>t</i>	: Triplet
THP-1	: Lignée monocytaire humaine
<i>uma</i>	: unité de masse atomique
UMR	: Unité Mixte de Recherche
UV	: Ultra-violet
UV (DAD)	: Détecteur ultraviolet à barrettes de diodes (diode array detector)
VERO	: Lignée de cellules de rein de singe
WHO	: World Health Organization.

Table de matières

Table de matières

Remerciements.....	a
Abréviations.....	i
Table de matières.....	v
I. Introduction générale.....	1
II. Synthèse bibliographique	
1. Zone de collecte : Dispositif de Tunquini.....	3
1.1. Caractéristiques de la Bolivie.....	3
1.2. Création des parcs Nationaux en Bolivie.....	4
1.3. Valorisation de la biodiversité.....	6
2. Antécédents sur <i>Hedyosmum angustifolium</i>.....	8
2.1. Taxonomie et distribution de la famille des Chloranthace.....	8
2.2. Caractères morphologiques généraux de la famille Chloranthaceae.....	9
2.3. Distribution et caractères morphologiques de l'espèce <i>H. angustifolium</i>	10
3. Données phytochimiques préalables sur la famille des Chloranthaceae.....	11
3.1. Généralités sur les sesquiterpènes lactones.....	12
3.2. Données phytochimiques sur l'espèce <i>H. angustifolium</i>	14
3.3. Données phytochimiques sur le genre <i>Hedyosmum</i>	14
3.4. Données phytochimiques sur d'autres genres de la famille Chloranthaceae...	16
4. Généralités sur les parasites de <i>Leishmania</i>.....	22
4.1. Historique.....	22
4.2. Identification et taxonomie des parasites du genre <i>Leishmania</i>	22
4.3. Distribution des différentes espèces de <i>Leishmania</i>	24
4.4. Cycle de vie et morphologie de <i>Leishmania sp.</i>	25
4.4.1. Phase extracellulaire : développement chez l'insecte.....	26
4.4.2. Phase intracellulaire : développement chez l'hôte mammifère.....	27

5. Épidémiologie sur la leishmaniose	28
5.1. Chiffres alarmants.....	28
5.2. Etudes épidémiologiques.....	29
5.3. Cas de co-infection HIV/leishmaniose.....	29
5.4. Situation de la leishmaniose en Bolivie.....	30
6. Manifestations cliniques de la maladie chez l'homme	32
7. Méthodes de diagnostic	34
7.1 Méthodes directes.....	34
7.2. Méthodes indirectes.....	35
8. Taxonomie et morphologie du vecteur	35
8.1. Contrôle des réservoirs et des vecteurs.....	36
9. Traitements contre les leishmanioses	37
9.1. Prix de médicaments utilisés contre les leishmanioses.....	40
9.2. Recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques contre les leishmanioses.....	41

III. Résultats et discussions

1. Bioprospection sur le dispositif de Tunquini	51
1.1. Résultats et discussion sur le suivi phénologique.....	52
1.2. Résultats et discussion de la valorisation pharmacologique.....	56
1.2.1. Premier criblage biologique effectué sur la totalité des espèces végétales.....	56
1.2.2. Vérifications des activités biologiques.....	61
2. Etude phytochimique bioguidée de <i>H. angustifolium</i> (Ruiz & Pav) Solms	64
2.1. Processus d'extraction bioguidée.....	64
2.2. Purification bioguidée de l'extrait acétate d'éthyle.....	66
2.2.1. Purifications et isolement des molécules M1 et M2.....	66
2.2.2. Purifications et isolement de la molécule M3.....	70
2.2.3. Purifications et isolement de la molécule M4.....	71
2.2.4 Purifications et isolement de la molécule M5.....	73
2.2.5 Purifications et isolement de la molécule M6.....	74
2.2.6 Purifications et isolement de la molécule M7.....	74
3. Détermination structurale des composé isolés de <i>H. angustifolium</i>	76
3.1. Détermination structurale du composé M1 : Onosériolide.....	76
3.2 Détermination structurale du composé M2: Oxyonosériolide.....	85
3.3 Détermination structurale du composé M3: Chloranthalactone A.....	94

3.4 Détermination structurale du composé M4: Hedyosmone.....	101
3.5 Détermination structurale du composé M5: Bolivianine.....	108
3.6 Détermination structurale du composé M6: Isobolivianine.....	119
3.7 Détermination structurale du composé M7: Spathuléol.....	130
3.8. Discussion : molécules isolées.....	136
4. Résultats des tests biologiques <i>in vitro</i>	144
4.1. Activités antileishmaniennes.....	144
4.1.1. Amastigotes axéniques.....	144
4.1.2. Amastigotes intracellulaires.....	147
4.2. Activités cytotoxiques.....	150
4.3. Activités antiplasmodiales.....	152
4.4. Discussion sur les résultats biologiques <i>in vitro</i>	155
5. Bilan de l'étude phytochimique bioguidée de <i>H. angustifolium</i>	157
IV. Conclusions et perspectives	159
V. Matériels et méthodes	
1. Recolte et échantillonnage du matériel végétal	163
1.1. Préparation des échantillons.....	164
2. Extractions	165
3. Méthodes chromatographiques	166
3.1. Méthodes chromatographiques analytiques.....	166
3.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM).....	166
3.1.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP/PDA).....	166
3.2. Méthodes chromatographiques semi-préparatives ou préparatives.....	167
3.2.1. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC).....	167
3.2.2. Chromatographie SPE sur cartouches de silice normale (SPE).....	168
3.2.3. Chromatographie préparative sur couche mince.....	168
3.2.4. Chromatographie liquide haute performance semi-préparative.....	168
4. Méthodes analytiques	170
4.1. Pouvoir rotatoire.....	170
4.2. Spectrométrie Infra-rouge (IR).....	170
4.3. Spectrométrie de masse (MS).....	170
4.4. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	171

5. Test biologiques	172
5.1. Tests réalisés sur <i>P. falciparum</i>	172
5.1.1. La culture <i>in vitro</i>	172
5.1.2. La synchronisation.....	172
5.1.3. Evaluation de l'activité antiplasmodiale.....	173
5.2. Tests de cytotoxicité réalisés sur des cellules MCF-7, VERO et THP-1.....	174
5.3. Tests <i>in vitro</i> réalisés sur <i>Leishmania sp.</i>	175
5.3.1. La culture des promastigotes <i>in vitro</i>	175
5.3.2. La culture des amastigotes axéniques <i>in vitro</i>	176
5.3.3. Evaluation de l'activité antileishmanienne <i>in vitro</i> sur <i>L. amazonensis</i>	176
5.3.4. Evaluation de l'activité antileishmanienne <i>in vitro</i> sur <i>L. infantum</i>	177
5.3.5. Evaluation de l'activité antileishmanienne <i>in vitro</i> sur la phase intramacrophagique.....	178
 VI. References bibliographiques	 181
 VII. Annexes	
Tableau de repartition des espèces du dispositif de Tunquini.....	195
Spectres RMN de l'oxyonosériolide de la bolivianine et de l'isobolivianine.....	201
 VIII. Publications	
Manuscript accepté pour publication dans Organic Letter.....	217
Manuscript accepté pour publication dans Biodiversity and Conservation.....	222
Manuscript accepté pour publication dans Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.....	230

I. Introduction générale

1.- Introduction

De nos jours, les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. L'utilisation thérapeutique des plantes est partie intégrante des traditions de toutes les cultures. La valorisation médicinale de ces pratiques passent notamment par l'isolement et l'identification de nouvelles molécules s'effectuant par des fractionnements guidés par l'activité sur une cible biologique. Ce travail conduit à l'identification du principe actif.

La Bolivie dispose d'une grande diversité floristique qui est protégée par la création de parcs nationaux permettant d'étudier, de connaître, de conserver et de mettre en place des systèmes d'exploitation durables et équitables des différentes ressources naturelles. Ces parcs sont gérés par le SERNAP (Service National des Aires Protégées), secrétariat qui dépend du ministère de l'environnement. Les autorités boliviennes veulent valoriser les ressources naturelles à travers la mise en route des différents projets de recherche et de développement. C'est ainsi que l'UMR-152 et l'Universidad Mayor de San Andres (La Paz, Bolivie) ont élaboré un projet de « valorisation de la flore bolivienne dans le Parc National de Cotapata PN-ANMI (dispositif de Tunquini) par la recherche des molécules antiparasitaires». Ce projet contribuera à la connaissance floristique du Parc National de Cotapata PN-ANMI ainsi qu'à la mise en place d'une chimiothèque patrimoniale vivante.

Sachant qu'en Bolivie il existe une importante diversité végétale (le nombre d'espèces de plantes spermatophytes est estimé de 18 000 à 20 000), les chances de trouver une plante active contre certaines maladies sont importantes. Cette richesse végétale est due à la grande variété des biotopes liés aux différences altitudinales ainsi qu'aux facteurs climatiques extrêmes, de la grande aridité dans les déserts du Sud à la forêt amazonienne.

Malheureusement, la Bolivie fait également partie des pays où beaucoup de maladies parasitaires sont endémiques, tels le paludisme, la maladie de Chagas et la leishmaniose. Selon des études épidémiologiques récentes [OPS/OMS, 2003; WHO, 2000], 3 600 000 de personnes sont en risque d'infection du paludisme. La population exposée à la maladie de

Chagas est d'environ 3 700 000 habitants, dont près de 1 800 000 présentent des signes cliniques. La leishmaniose est présente dans le pays dans six des neuf départements

Plusieurs facteurs sont responsables de l'insuffisance des traitements antiparasitaires : le prix des médicaments est élevé, les traitements montrent des effets toxiques très importants et on recense des résistances des parasites aux thérapeutiques et des vecteurs aux insecticides. De plus l'augmentation de la migration des gens non immunisés vers les zones à risque et un système de sécurité sociale qui concerne à peine 20% de la population bolivienne contribuent à rendre plus difficile l'éradication de ces parasitoses.

Dans ce cadre, mon sujet de thèse est centré sur la recherche par bioguidage de substances naturelles antileishmaniennes. L'objectif principal de ma thèse est la recherche, l'isolement et identification de molécules antileishmaniennes isolées de *Hedyosmum angustifolium*.

- Dans un premier chapitre, nous présenterons le dispositif de Tunquini au sein du Parc National de Cotapata PN-ANMI. Nous détaillerons les connaissances botaniques, phytochimiques de la famille des Chloranthaceae et plus particulièrement de l'espèce *Hedyosmum angustifolium*. Nous effectuerons également une présentation de la leishmaniose en précisant l'impact de cette maladie dans le monde et en Bolivie, son épidémiologie locale, les symptômes qui la caractérisent et les thérapeutiques actuellement utilisées.
- Le second chapitre sera consacré à l'étude phytochimique bioguidé de *Hedyosmum angustifolium* (Ruiz & Pav.) Solms. Dans ce chapitre nous détaillerons les étapes de fractionnement, de purification et nous décrirons le processus d'identification et d'élucidation structurale des composés isolés. Une présentation des résultats biologiques obtenus *in vitro* sera détaillée ainsi que la discussion des résultats obtenus.
- Pour finir nous présenterons les conclusions et perspectives issues de ce travail de recherche.

II. Synthèse bibliographique

1.- Zone de collecte : Dispositif de Tunquini

1.1.- Caractéristiques de la Bolivie

La Bolivie se situe au centre de l'Amérique du Sud et s'étend sur une surface de 1 098 581 Km². C'est un des pays les plus riches en biodiversité de la planète (faune et flore), ce qui est notamment dû aux grandes variations d'altitude et à sa situation tropicale. En effet, ce pays est traversé par les Andes qui occupent le secteur occidental du pays. Cette chaîne montagneuse se divise en deux branches ou cordillères, la cordillère occidentale ou volcanique à l'Ouest du pays et la cordillère orientale plus à l'intérieur des terres. Entre ces deux massifs montagneux se trouve le haut plateau nommé Altiplano (environ 4000 mètres d'altitude). Toutefois, cette riche biodiversité n'est que peu étudiée [Ibisch, 2003]

La présence de ces deux cordillères divise le territoire bolivien en deux zones biogéographiques. La région orientale qui occupe 70 % du territoire est caractérisée par la présence d'une végétation exubérante liée à l'existence de plaines basses, chaudes et humides. Ensuite, la région occidentale ou région andine est caractérisée par la présence d'une végétation plutôt originaire des climats froids et arides. Finalement, une région de transition entre la cordillère orientale et les plaines orientales est connue sous le nom de « Los Yungas », couverte de végétations de haute altitude est constituée en partie par des espèces de la plaine amazonienne. De plus, elle est considérée comme une zone de haute biodiversité présentant un grand endémisme.

La Bolivie possède donc un réservoir de diversité biologique important et encore mal connu. En effet, environ 20 000 spermatophytes ont été décrits à ce jour avec un endémisme de 20 % [Ibisch et Beck, 2003]. Compte tenu de cette abondante diversité biologique, les autorités ont décidé d'organiser certaines régions en parcs nationaux.

1.2.- Création des parcs nationaux en Bolivie

La création des parcs nationaux dans les pays en voie de développement permet d'étudier, de connaître, de conserver et de mettre en place des systèmes d'exploitation durables des différentes ressources naturelles. En effet en Bolivie il existe 22 parcs nationaux avec une surface totale de 17 066 902 ha représentant 17% du territoire national bolivien [SERNAP, 2001]. Ces parcs sont créés et gérés en accord avec les articles décrits par la Convention sur la Diversité Biologique (CBD) qui a trois objectifs principaux : la conservation de la biodiversité, l'exploitation durable et le partage équitable de l'utilisation des ressources génétiques (United Nations Environment Program UNEP 1992, Article 1) [Svarstad *et al.*, 2000]. De plus l'Article 7 de cette convention, explique que pour bien mener une exploitation durable il faut connaître davantage les variations de distribution et l'abondance des différentes espèces [Joshi *et al.*, 2006]. L'idée d'une exploration des ressources biologiques a été mise en place par Thomas Eisner (1989 et 1991).

C'est le cas du Parc National de Cotapata PN-ANMI (Parque Nacional y Área Natural de Manejo Integrado) qui a pour objet la conservation de la biodiversité et le développement durable des ressources naturelles. Ce parc est constitué par différents ensembles naturels de flore et de faune avec un grand endémisme. Il a été créé en 1993 (Decreto Supremo (DS) N°. 23547) [SERNAP, 2001].

Le PN-ANMI se trouve à 90 km de La Paz (capitale administrative de la Bolivie). Il se situe dans la région de transition, zone dite des Yungas. Il s'étale sur une surface de 61 000 ha entre 5600 et 1100 m d'altitude. Ses coordonnées sont les suivantes : 68°02' et 16°20' SO, 68°03' et 16°05' NO, 67°43' et 16°10' NE y 67°47' et 16°18' SE. Il est soumis à une précipitation annuelle moyenne de 2901 mm avec une saison sèche marquée qui se déroule entre avril et septembre. La température moyenne annuelle est de 20°C (figure 1) [Ribera-Arismendi, 1995]. De plus, le PN-ANMI concentre sur cette surface réduite environ 1800 espèces de plantes supérieures [Colectivo, 2003] dont seulement 735 espèces ont été identifiées [SERNAP, 2001]

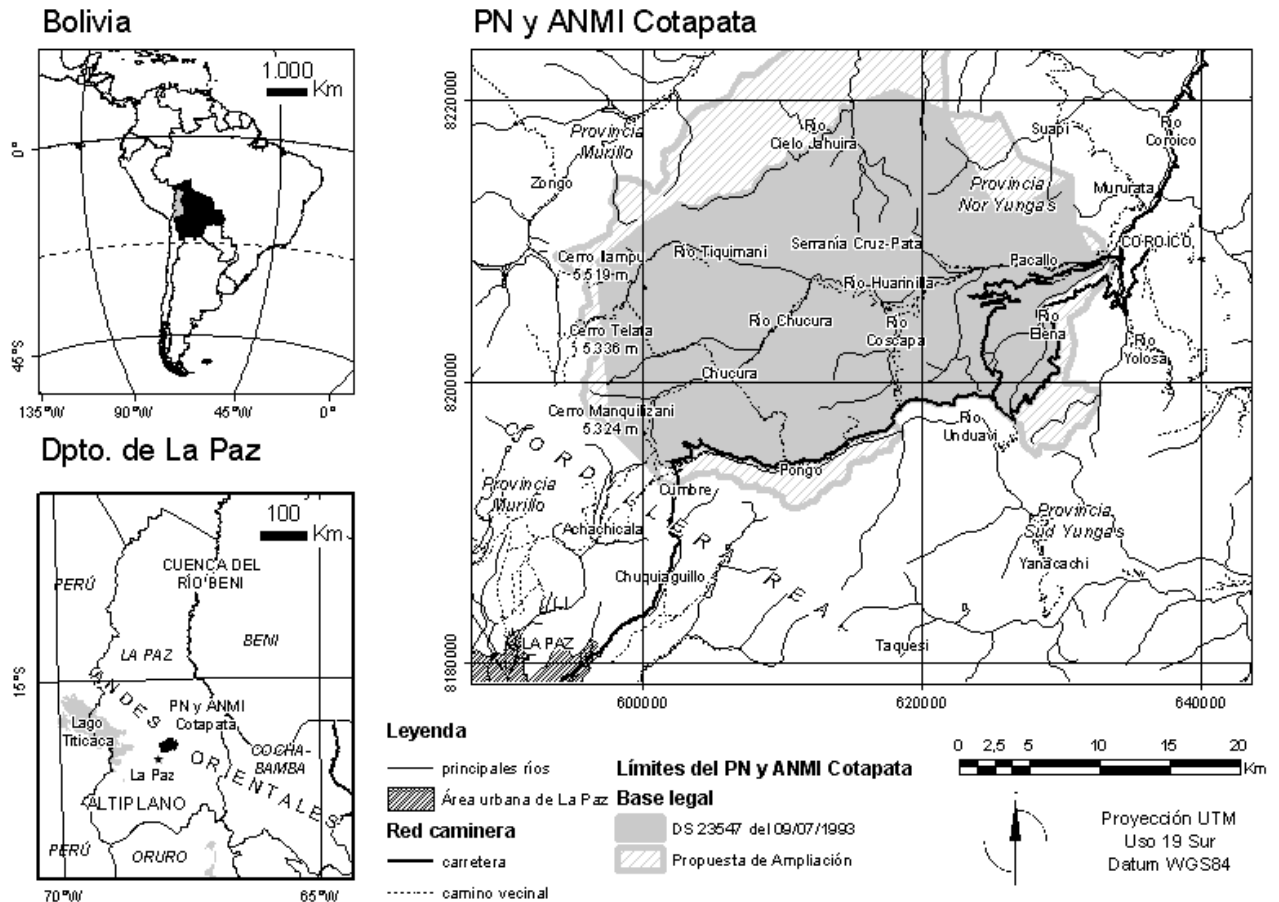


Figure 1.- Localisation du Parc National de Cotapata PN-ANMI

Ce parc est essentiellement constitué de forêts montagneuses, qui sont parmi les écosystèmes les moins connus et les plus menacés des tropiques [Carrizosa, 1990; Dodson et Gentry, 1991; Henderson *et al.*, 1991]. Du fait de leur complexité topographique et de leur histoire biogéographique, ces forêts présentent des communautés biologiques caractérisées par un endémisme élevé [Gentry, 1993; Myers *et al.*, 2000]. Les facteurs comme l'altitude jouent un rôle important dans la composition de ces écosystèmes. Ainsi les forêts du pied de la montagne sont les plus riches en espèces alors que la diversité floristique diminue avec l'altitude [Gentry, 1993]. Les forêts de montagne en Bolivie appartiennent à la chaîne montagneuse de la Cordillère Royale et sont considérées comme des écosystèmes très riches et de grand intérêt pour la conservation des espèces qui s'y trouvent [Moraes, 2000].

Dans ce contexte, l'Institut d'Ecologie de l'Universidad Mayor de San Andrés (UMSA-La Paz), a créé et installé en 1998 une station permanente dans le PN-ANMI (Station Ecologique de Tunquini) (figure 2) qui a été l'instrument d'une panoplie d'études climatologiques, zoologiques et botaniques, assurant de cette façon l'accès de chaque groupe

de travail à la biodiversité en fonction de leur objectifs [Deem *et al.*, 2004; Kromer *et al.*, 2005].



Figure 2.- Station écologique de Tunquini au sein de PN-ANMI

1.3.- Valorisation de la biodiversité

La Bolivie commence à prendre conscience de la grande biodiversité qu'elle possède. Ces dernières années un des objectifs des gouvernements qui se sont succédé est de valoriser ces patrimoines naturels en créant différentes voies de recherches et de développement durable. Une des voies est la connaissance, l'identification et la valorisation des ressources végétales. Un des exemples de cette valorisation est l'utilisation des plantes où des produits naturels dans le domaine de la santé [Balick et Mendelsohn, 1992]. A l'échelle mondiale, la moitié des médicaments actuellement commercialisés sont d'origine naturelle, essentiellement végétale ou microbienne [Cordell, 2000].

43 entreprises liées aux différentes étapes de l'industrialisation des différentes plantes médicinales sont implantées en Bolivie. 63 % de ces entreprises produisent des substances médicinales issues de ces espèces végétales. 30 % produisent la matière première soit par la collecte soit par l'agriculture. Les entreprises restantes s'axent sur la cosmétique et l'alimentaire. Parmi ces plantes quelques espèces sont plus particulièrement utilisées : *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C., *Cynara scolymus* L., *Lepidium meyenii* Walp, *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers., *Matricaria chamomilla* L., *Valeriana officinalis* L [Gupta, 2006].

La méthode la plus utilisée pour sélectionner des substances naturelles utiles dans le domaine de la santé est la connaissance de la médecine traditionnelle. Les plantes médicinales ne représentent toutefois qu'une partie des espèces végétales existantes dans les zones de haute biodiversité. La démarche ethnopharmacologique est également limitée par les revendications légitimes des communautés indigènes propriétaires du savoir initial [Lewis *et al.*, 1999].

Une autre méthode peu utilisée et à la fois innovatrice est basée sur la délimitation des différents biotopes en fonction de l'altitude, c'est le cas du Parc National de Cotapata PN-ANMI. La délimitation de biotopes dans le parc a été mise en place par Ribera-Arismendi [Ribera-Arismendi, 1995]. Ceci permet un accès aux ressources végétales, avec la possibilité d'effectuer des prélèvements limités, un inventaire taxonomique de toutes les espèces végétales présentes et le suivi phénologique des espèces principales. Un des avantages de cette méthode est de pouvoir étudier et valoriser les espèces les plus abondantes notamment dans le domaine de la santé en constituant une chimiothèque permanente et vivante. Cette exploration est rendue possible grâce aux nouvelles techniques de criblages pharmacologiques qui permettent d'évaluer rapidement de nombreux extraits.

Le Parc National de Cotapata PN-ANMI, du fait de la haute diversité avec un degré d'endémisme important a été divisé en six biotopes. Ceci facilite l'exploration des potentialités pharmacologiques de la biodiversité végétale. En effet, un projet entre l'UMR-152 et l'Universidad Mayor de San Andres (La Paz, Bolivie) a permis de mettre en place des parcelles permanentes dans 2 de ces biotopes présentant la plus grande biodiversité. Dans ces parcelles, les botanistes du projet ont effectué un relevé systématique des arbres, des arbustes et des espèces herbacées fertiles et abondantes. Tous les arbres ont été marqués pour permettre un suivi phénologique tout au long du projet. Cette information contribuera à la connaissance floristique de la biodiversité du PN-AMI. La deuxième étape du projet consiste en la récolte et le criblage des espèces préalablement identifiées en vue de la détermination de l'activité sur différentes cibles biologiques et de l'identification des molécules actives.

Ce projet consiste notamment à explorer le potentiel pharmacologique de cette chimiothèque vivante. Les échantillons ont été criblés sur différentes cultures de parasites. Parmi les espèces actives un extrait acétate à l'éthyle de *Hedyosmum angustifolium* s'est avéré potentiellement actif.

2.- Antécédents sur *Hedyosmum angustifolium*

2.1.- Taxonomie et distribution de la famille des Chloranthaceae

Hedyosmum angustifolium (Ruiz & Pavón) Solms-Laubach, appartient à la famille des Chloranthaceae. Cette famille regroupe 4 genres (*Sarcandra*, *Chloranthus*, *Ascarina* et *Hedyosmum*) et 75 espèces. Ce sont des arbres, des arbustes et des plantes herbacées annuelles ou pérennes, qui se distribuent dans les régions sub-tropicales et tropicales de l'Amérique centrale, de l'Amérique du Sud, de l'Asie du sud-est ainsi qu'à Madagascar et en Nouvelle Zélande (figure 3) [Todzia, 1988, 1993].

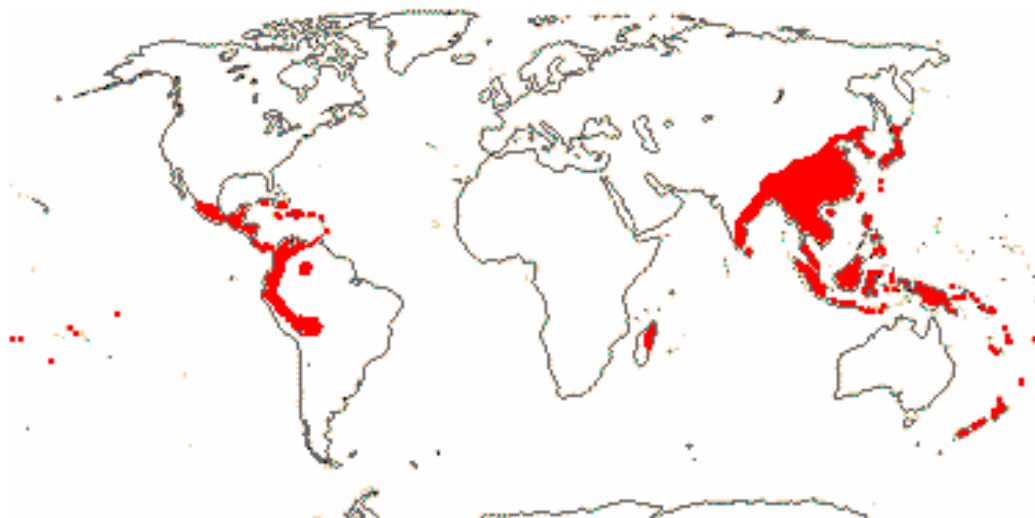


Figure 3.- Distribution des espèces appartenant à la famille de Chloranthaceae
[Stevens, 2001]

Selon les classifications botaniques classiques pré-moléculaires, les Chloranthaceae sont des dicotylédones appartenant à l'ordre des Pipérales (tableau 1) [Cronquist, 1988].

Classification classique : Plantae	
Sous-règne :	Tracheobionta (plantes vasculaires)
Embranchement :	Spermatophyta (plantes à graines)
Sous-embranchement :	Angiospermae (plantes à fleurs)
Classe :	Magnolopsida (Dycotylédones)
Ordre :	Pipérales
Famille :	Chloranthaceae

Tableau 1.- Position systématique selon Cronquist [Cronquist, 1988]

En 1998, un groupe de chercheurs (Angiosperm Phylogeny Group, APG) élabore un nouveau système de classification basé sur des critères de la cladistique moderne ou de la systématique moléculaire. Ce système de classification prend en compte les séquençages des mitochondries ou l'ARN des ribosomes donnant naissance en 1998 à une nouvelle classification des plantes à fleur (APG, 1998). Ce nouveau système de classification **APG I** est aujourd'hui le plus utilisé et met en avant les caractéristiques phylogénétiques [Spichiger *et al.*, 2000].

Ainsi, au sein des Angiospermes, les Chloranthaceae sont des monocotylées à pollen sans aperture, à exine réduite à de fines épines. Cette famille est regroupée dans l'ordre de Laurales [Judd *et al.*, 2002] (tableau 2). Toutefois cette classification a été révisée en 2003 : **APG II 2003** en fonction des dernières avancées en matière de biologie moléculaire [Password, 2003].

Selon les nouvelles considérations phylogénétiques, la position systématique des Chloranthaceae est controversée et requiert plus d'études. En effet, les Chloranthaceae sont proches génétiquement du super-ordre des Magnoliides ainsi que des Eudicots. En attendant d'obtenir plus d'information l'ordre de Chloranthales a été créé avec la seule famille Chloranthaceae [Password, 2003] (tableau 2).

	Classification selon l'APG I	Classification selon l'APG II
Division :	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Ordre :	Laurales	Chloranthales
Famille :	Chloranthaceae	Chloranthaceae

Tableau 2.- Récente position systématique de la famille des Chloranthaceae

2.2.- Caractères morphologiques généraux de la famille Chloranthaceae

La famille des Chloranthaceae comprend des espèces très odorantes. Leurs feuilles sont généralement opposées, simples, entières, alternes à nervation palmée, souvent dentées, velues ou glabres. Leurs bois sont dépourvus de vaisseaux et leurs nœuds sont renflés et possèdent des stipules engainantes. Leurs inflorescences sont disposées en épis, et peuvent être terminales ou axillaires. Leurs fleurs sont unisexuées ou hermaphrodites (plantes monoïques ou dioïques) paraissant actinomorphes, minuscules, chacune se situant à l'aisselle d'une bractée peltée largement triangulaire. Leurs fleurs mâles (*Ascarina* et *Hedyosmum*) sont

réduites et possèdent des étamines déhiscentes par des fentes longitudinales 1-3(-5). Les fleurs hermaphrodites dans le cas de *Chloranthus* et *Sarcandra* possèdent un carpelle, des stigmates capités, tronqués et lobés. Leurs fruits sont habituellement des drupes [Judd *et al.*, 2002].

2.3.- Distribution et caractères morphologiques de l'espèce *Hedyosmum angustifolium*

Hedyosmum vient du grec **hedys** (agréable) et **osmé** (odeur) du fait de l'odeur fort agréable que les feuilles dégagent lorsqu'elles sont froissées. Le genre *Hedyosmum* comprend 44 espèces qui se distribuent au long des régions tropicales de l'Amérique du Sud et de l'Amérique Centrale et une des espèces se trouve en Asie Orientale [Todzia, 1993]. Plus précisément l'espèce *H. angustifolium* se distribue habituellement entre 900 m et 2000 m d'altitude, il est possible de les retrouver parfois jusqu'à 2400 m d'altitude [Todzia, 1988]. L'aire de répartition de cette espèce s'étend de l'Equateur à la Bolivie (figure 4).



Figure 4.- Distribution de l'espèce *H. angustifolium*

Les individus de cette espèce sont des arbres qui peuvent atteindre environ 12 mètres de hauteur, ce sont des espèces très odorantes qui possèdent un tronc plutôt glabre. Les feuilles sont brillantes et glabres, et peuvent être elliptiques ou oblongues. Les inflorescences mâles sont terminales ou axiales, en forme d'épi avec des petites fleurs réduites à une seule

étamine, soutenues par une paire de bractées. Les inflorescences femelles sont terminales ou axiales et sont regroupées en cimulas, soutenues par une bractée, possédant un stigmate sessile, large et lobé. De même, le périanthe est lobé. Les fruits sont des drupes [Todzia, 1988] (figure5).

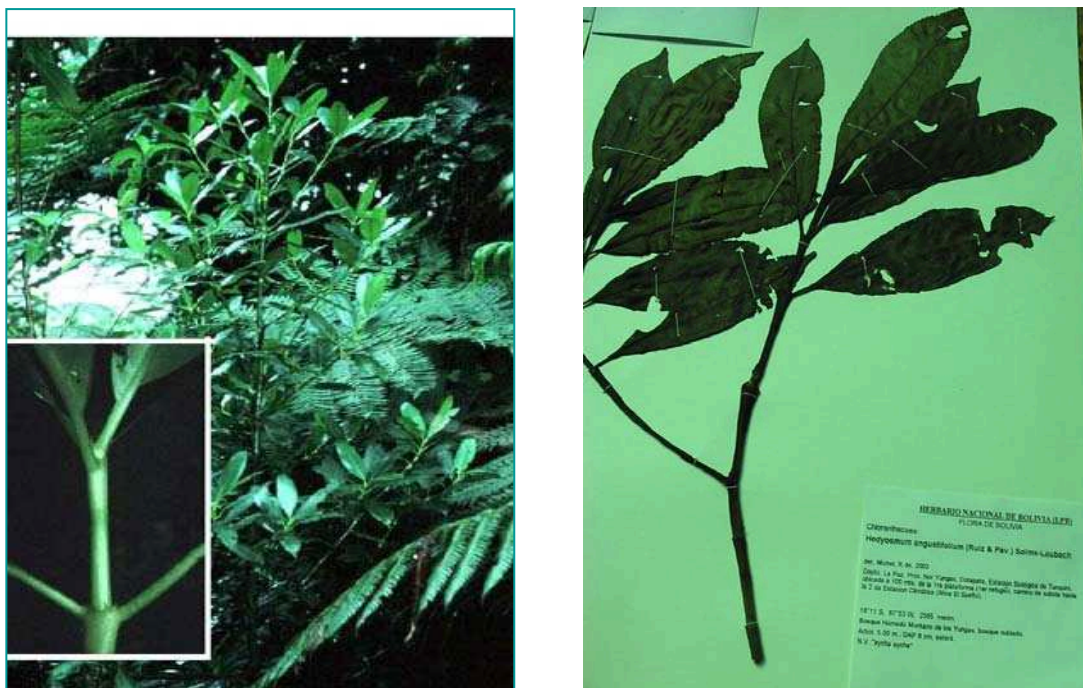


Figure 5.- Photos *H. angustifolium*

Hedyosmum angustifolium, est connu en Bolivie sous le nom de « Chemelaque », « Malva », « Hierba de la Vida » et « Matico Menta ». Les feuilles de cette espèce sont utilisées en médecine traditionnelle en tant que antirhumatismaux et contre les poussées de fièvre [Lorenzo *et al.*, 2003].

3.- Données phytochimiques préalables sur la famille des Chloranthaceae

Comme nous allons le détailler plus loin, les lactones sesquiterpéniques de type lindénane sont des métabolites secondaires caractéristiques de la famille de Chloranthaceae. Ces molécules ne sont pas très répandues dans les autres familles de plantes. Ces molécules ont été même proposées comme des marqueurs chimiotaxonomiques [Kawabata et Mizutani, 1988]. Nous allons donc présenter quelques généralités sur les lactones sesquiterpéniques notamment les mécanismes de biogenèse et les propriétés biologiques.

3.1- Généralités sur les sesquiterpènes lactones

Les lactones sesquiterpéniques sont issues de la cyclisation d'un précurseur terpène, le farnésylpyrophosphate (FPP) qui donne le germacradiène. Sur le schéma 1 nous observons que le germacranolide représente le groupe biogénétiquement à l'origine de toutes les lactones sesquiterpéniques (schéma 1) [Zhang *et al.*, 2005].

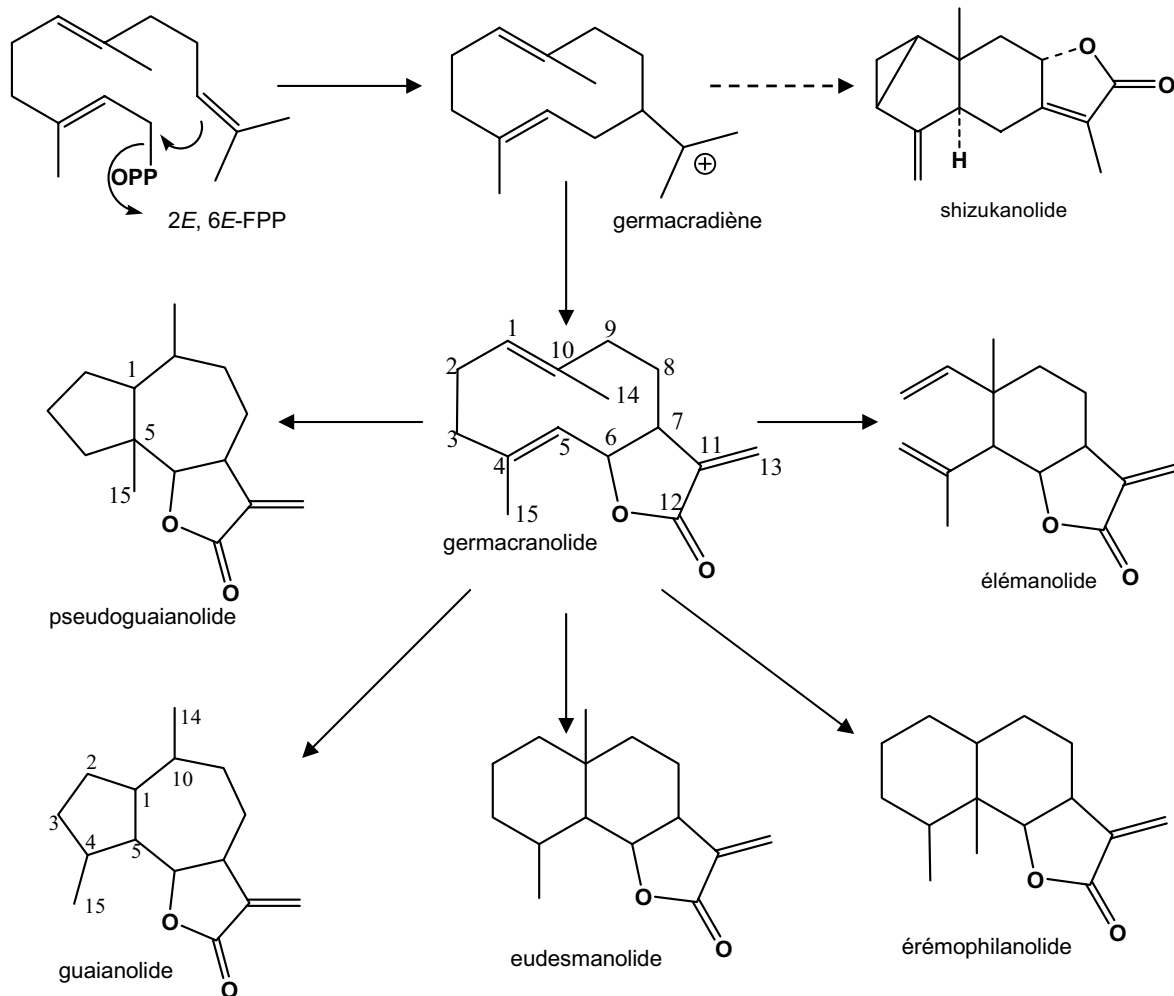


Schéma 1.- Biogenèse des lactones sesquiterpéniques [Bruneton, 1999]

De plus, la biogenèse des lactones sesquiterpéniques de type lindenanes n'est pas encore déterminée de façon certaine, mais fait l'objet d'hypothèse faisant intervenir un intermédiaire de type furanogermacranolide (schéma 1 pointillés) [Kawabata *et al.*, 1981].

En général, l'activité biologique des lactones sesquiterpéniques est due à l'alkylation des nucléophiles grâce à la présence d'un carbonyle insaturé comme par exemple, le α -méthylène γ -lactone (schéma 2). Ces molécules réagissent surtout avec des groupes cystéine sulfhydrique par des additions de type Michael [Zhang *et al.*, 2005].

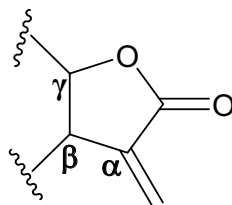
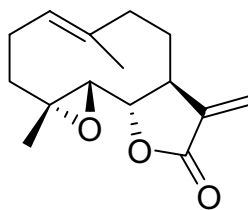


Schéma 2.- Structure générale d'une α -méthylène γ -lactone

Des études faites sur la relation structure activité de ces molécules ont démontré que la présence du groupe exométhylène de la lactone est essentiel à l'observation de la cytotoxicité car des modifications structurales telles qu'une saturation ou une addition sur l'exométhylène entraîne la perte de l'activité cytotoxique ou de l'activité antitumorale [Zhang *et al.*, 2005].

Diverses drogues renfermant ce type de composés existent, mais nous ne citerons ici que l'exemple d'une molécule antileishmanienne, le parthénolide (structure 1), isolé de *Tanacetum parthenium* (L) Schultz-Bip, (ou grande camomille) appartenant à la famille des Asteraceae. La drogue est constituée par les parties aériennes séchées, soient entières ou fragmentées de la plante. Cette drogue est connue traditionnellement pour ses propriétés antimigraineuses. Le principe actif supposé est une lactone sesquiterpénique, le parthénolide. Cette molécule a été décrite comme un inhibiteur de la transcription du facteur NF- κ B (facteur impliqué dans l'activation du processus inflammatoires) qui inactive l'oxyde nitrique synthétase (iNOS). Elle peut aussi inhiber la formation d'œdème sur des rats et des souris en inhibant la réponse inflammatoire et montre une propriété antidouleurs [Calixto *et al.*, 2001; Kwok *et al.*, 2001]. Le parthénolide a une activité intéressante sur de cultures promastigotes *in vitro* de *Leishmania amazonensis* avec un IC_{50} de $0,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$. De plus, à une concentration de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, cette molécule inhibe de 84,7 % l'internalisation des parasites dans des macrophages. Finalement, l'indice de sélectivité (macrophages/parasites) est de 37,8 c'est-à-dire qu'elle est plus active sur les parasites que sur le macrophages [Tiuman *et al.*, 2005].



1

Figure 6.- Structure du parthénolide, principe actif de la Grande Camomille

3.2.- Données phytochimiques sur l'espèce *Hedyosmum angustifolium*

L'espèce *H. angustifolium* a été peu étudiée. En effet, une seule étude a été effectuée par une équipe de chercheurs boliviens. Cette étude est centrée sur l'identification des composants des huiles essentielles, elle a été réalisée par GC - MS (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse). Ils ont mis en évidence la présence de monoterpènes hydrocarbonés (64%) en particulier de l' α - et du β -pinène et du sabinène. Des monoterpènes oxygénés ont été également décrits comme le 1,8-cinéole et de linalol. Les sesquiterpènes hydrocarbonés comme le germacrane D, le α -gurjunène et le (E)- β -farnésène représentent 26 % des molécules identifiées. Le reste étant composé de sesquiterpènes oxygénés comme le spathuléol et le (E)-nérolidol [Lorenzo *et al.*, 2003].

3.3.- Données phytochimiques sur le genre *Hedyosmum*

Dans cette partie nous présenterons les données phytochimiques d'autres espèces du genre *Hedyosmum*. Il faut remarquer que le genre *Hedyosmum* n'a fait l'objet que d'un nombre restreint de recherches. Lesquelles sont surtout centrées sur l'identification d'huiles essentielles.

Une première étude a été réalisée sur *Hedyosmum scabrum* dans les mêmes conditions expérimentales que *H. angustifolium*, mettant en évidence la présence de monoterpènes hydrocarbonés où le principal constituant est le δ -3-carène (12,1 %) [Lorenzo *et al.*, 2003].

D'autres recherches ont été faites sur les feuilles et les fruits des espèces de *Hedyosmum mexicanum*, *H. bonplandianum* et *H. costaricensis* en décrivant les compositions chimiques de leurs huiles essentielles. La comparaison de la composition de ces huiles

essentielles montre la présence majoritaire de sabinène chez *H. mexicanum* et *H. bonplandianum*. Par contre chez *H. costaricensis* ce monoterpène hydrocarboné n'est pas présent, mais la molécule majoritaire est le germacrène -D. Finalement, un groupe intéressant de molécules présentes surtout chez *H. mexicanum* est la série des furanosesquiterpènes comme le furanodiène et le furanoélémente [Mundina *et al.*, 2000].

Toutefois il existe quelques études portant sur l'isolement d'autres molécules organiques dont certaines présentent des activités biologiques intéressantes.

Tout d'abord, les feuilles d'*H. bonplandianum*, plante utilisée dans la médecine traditionnelle en Colombie, ont été étudiées pour leur activité analgésique. Les résultats de ce travail ont démontré que les molécules responsables étaient des flavonoïdes glycosylés : le kaempferol 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] et le kaempferol 3-O-[β -D-glucopyranoside] (structure 2 et 3) [Cardenas *et al.*, 1993].

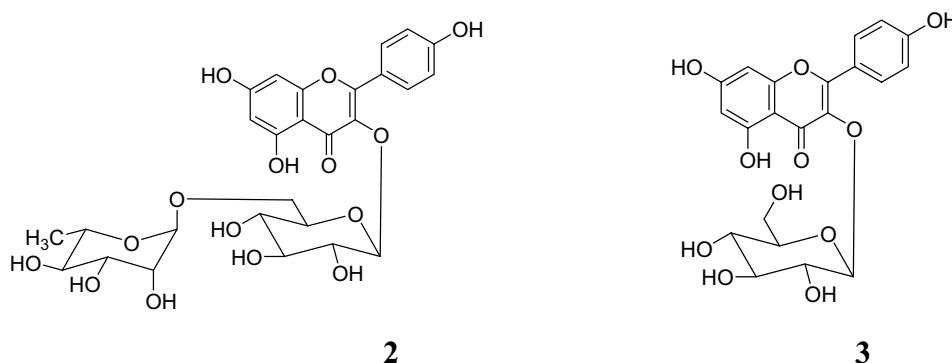


Figure 7.- Structures de flavonoïdes glycosylés issues d'*H. bonplandianum*

La même espèce *H. bonplandianum* a été le sujet d'un criblage préliminaire effectué sur des plantes médicinales de Panama. L'équipe de recherche a travaillé sur l'extrait brut détanifié, montrant une inhibition de la liaison de [3 H] BQ-123 sur son récepteur endothéline A impliqué dans la vasoconstriction [Caballero-George *et al.*, 2001].

Ensuite, les travaux sur des feuilles et des tiges de l'espèce *Hedyosmum brasiliense* ont permis d'isoler le 13-Hydroxy-8,9-déhydroshizukanolide de l'extrait hydro alcoolique. Cette molécule a montré une activité anti-nociceptive (anti-douleurs) très intéressante [Trentin *et al.*, 1999]. De même, ce sesquiterpène a été isolée pour la première fois d'*Onoseris albicans* et publié sous le nom d'Onosériolide (structure 4) [Bohlmann *et al.*, 1980].

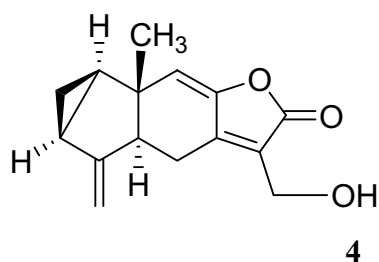


Figure 8.- Structure de l'Onosériolide issue de *H. brasiliense* et *Onoseris albicans*

Enfin, de l'extrait des feuilles de l'espèce *Hedyosmum arborescens* a été isolé un nouveau guaianolide, le 7,10-époxy-hedyosminolide (structure 5) [Bercion *et al.*, 2005].

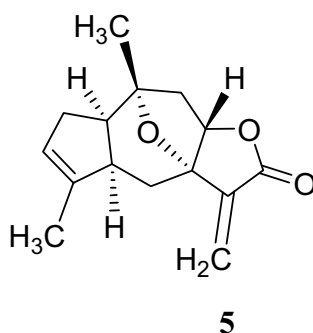
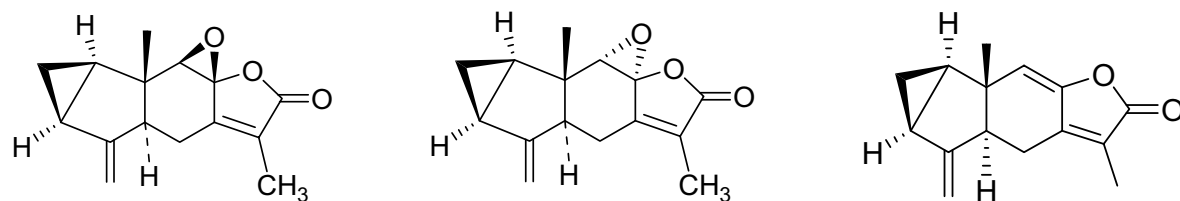


Figure 9.- Structure du 7,10-époxy-hedyosminolide isolée d'*H. arborescens*

3.4.- Données phytochimiques sur d'autres genres de la famille Chloranthaceae

La famille Chloranthaceae comporte trois autres genres (*Sarcandra*, *Chloranthus* et *Ascarina*). Dans cette partie nous présenterons donc les données phytochimiques propres à ces genres. Les lactones sesquiterpéniques et analogues constituent les molécules caractéristiques de cette famille de plantes.

Des études sur les feuilles de l'espèce *Chloranthus glaber*, plante médicinale utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise, a permis d'isoler et d'identifier un sesquiterpène de type lindénane, la chloranthalactone F (structure 6), et d'autres molécules déjà décrites, comme la chloranthalactone B (structure 7), chloranthalactone A (structure 8) et chloranthalactone E ainsi que l'atractylénolide II et le (-)-4 β ,7 α -dihydroxyaromadendrane [Takeda *et al.*, 1993].



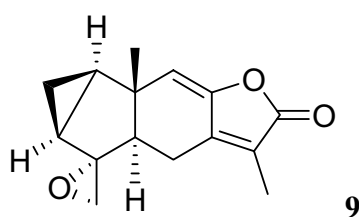
6 : chloranthalactone F

7 : chloranthalactone B

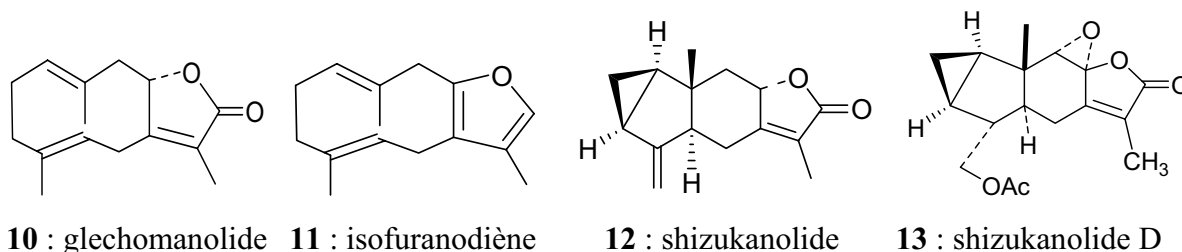
8 : chloranthalactone A

Figure 10.- Structures isolées de *C. glaber*

Une autre plante utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise, *Sarcandra glabra*, possède dans ses feuilles une nouvelle lactone sesquiterpénique de type cycloudesmanolide, la chloranthalactone G (structure 9) [Tsui et Brown, 1996].

Figure 11.- Structure de la chloranthalactone G isolée de *S. glabra*

De plus, l'équipe de Kawabata a travaillé pendant plusieurs années sur *Chloranthus japonicus*. En effet, ils ont isolé quatre sesquiterpènes lactones : le glechomanolide, l'isofuranodiène et le shizukanolide (structure nouvelle), le déhydro-shizukanolide (décrit comme chloranthalactone A) qui montre une activité moyenne sur les champignons, (structures 10, 11, 12 et 8) [Kawabata *et al.*, 1981]. De la même espèce végétale, un nouveau lindénanolide hautement oxygéné a été aussi isolé et identifié : le shizukanolide D, (structure 13) [Kawabata et Mizutani, 1989].



10 : glechomanolide

11 : isofuranodiène

12 : shizukanolide

13 : shizukanolide D

Figure 12.- Structures isolées de *C. japonicus*

De la même espèce, il a pu être isolé un autre type de lactone sesquiterpénique de type lindénane, les shizukaols et leurs dérivés. L'extrait des racines de *C. japonicus* contient plusieurs représentants des lindénanes dimériques : le shizukaol A (structure 14) [Kawabata *et al.*, 1990] et les shizukaols E, F, G, H et I (structures 15-19) [Kawabata *et al.*, 1995]. De plus, le trishizukaol A (structure 20) un nouveau lindénane trimérique a été aussi isolé et identifié. [Kawabata *et al.*, 1998].

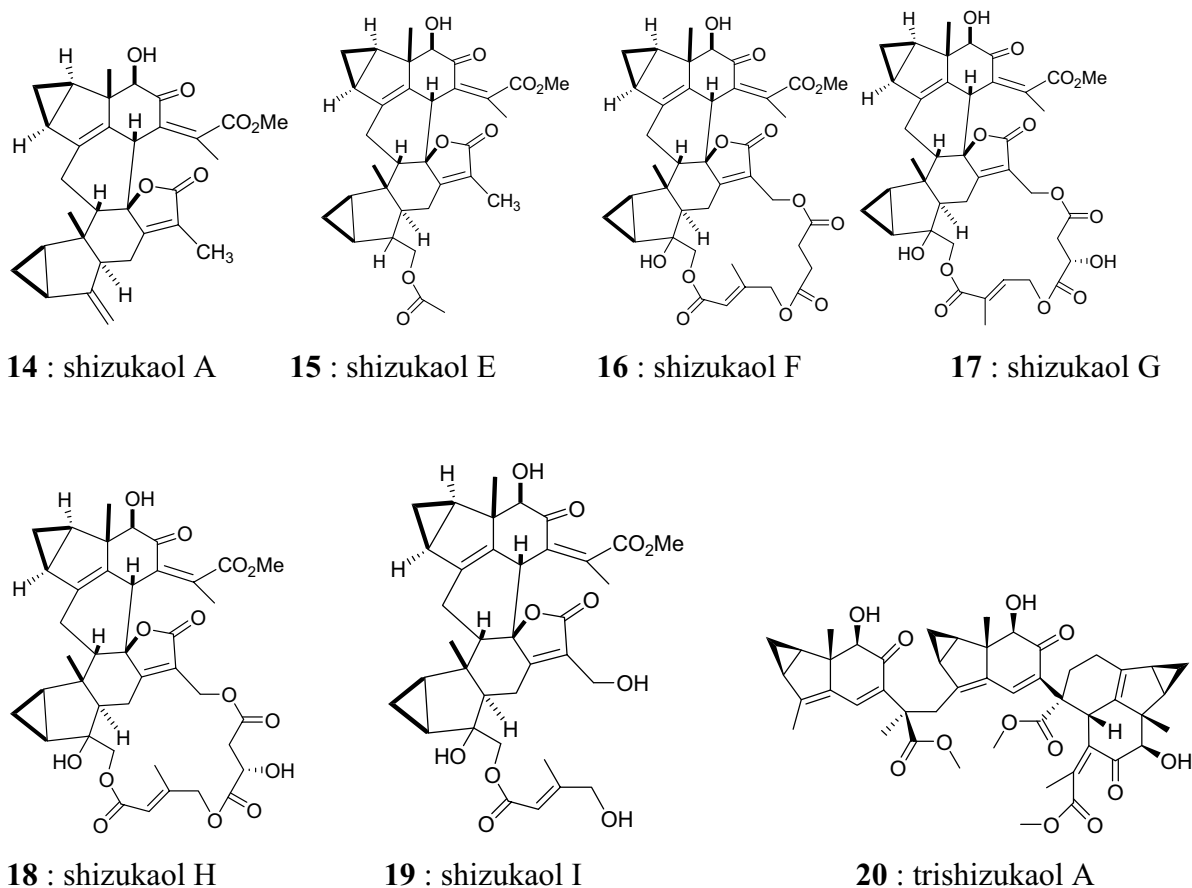
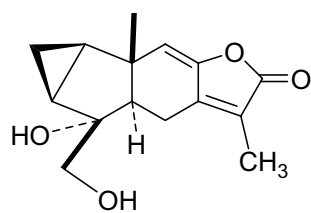
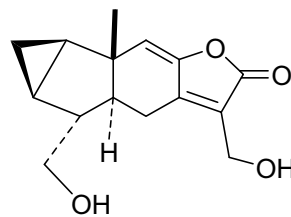


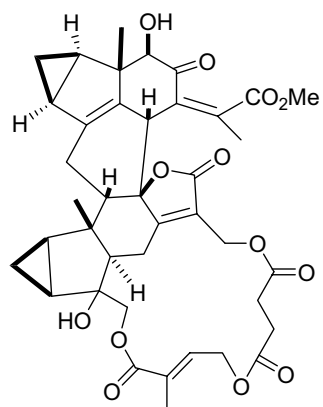
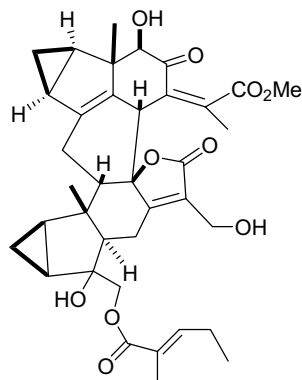
Figure 13.- Structures des différentes molécules isolées à partir des extraits de *C. japonicus*

De la même façon, l'équipe de Kawabata a travaillé sur des racines fraîches de l'espèce *C. serratus* permettant l'isolation d'autres lindénanes : les shizukanolides E et F (structures 21 et 22) [Kawabata et Mizutani, 1989].

**21** : shizukanolides E**22** : shizukanolides FFigure 14.- Structures isolées de *C. serratus*

Ainsi que trois autres lactones sesquiterpéniques de type lindénanes dimériques les shizukaols B, C et D (structures 23, 24 et 25) [Kawabata et Mizutani, 1992]. De plus, ils ont identifié un nouveau lindénane cyclique dimérique, le cycloshizukaol A (structure 26) [Kawabata *et al.*, 1993].

De plus, le shizukaol B, le cycloshizukaol A et le shizukaol F ont été décrits comme des molécules ayant une activité prometteuse contre l'athérosclérose. Ils inhibent l'expression des molécules impliquées dans le processus d'adhésion cellulaire avec des valeurs de MIC de 34,1 nM, 0,9µM et 27,3 nM respectivement [Kwon *et al.*, 2006].

**23** : shizukaol B**24** : shizukaol C

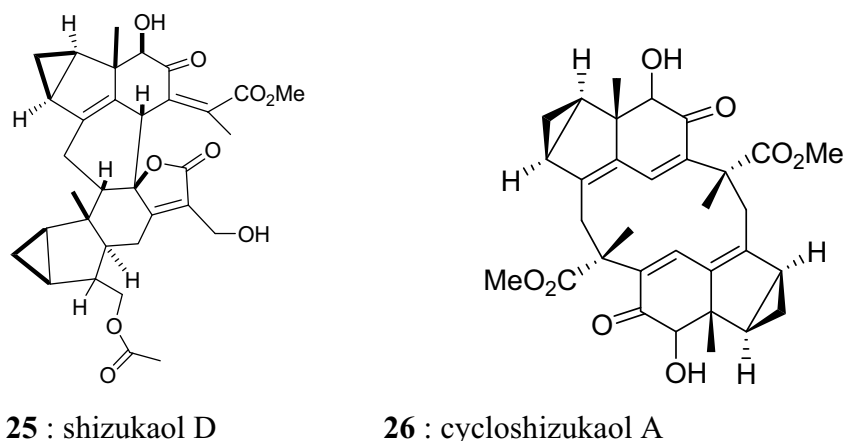


Figure 15.- Structures des différentes molécules isolées à partir de *C. serratus*

Une autre espèce de plante utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise, *Chloranthus multistachys*, a été étudiée. En effet, l'extrait des racines a permis d'identifier un sesquiterpénoïde dimérique complexe, la chloramultilide A qui est un analogue du shizukaol B (structure 27) [Yang et Yue, 2006].

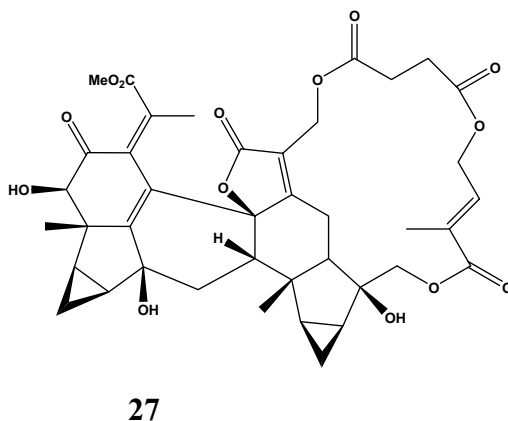


Figure 16.- Structure de chloramultilide A isolée de *C. multistachys*

Ensuite, à partir *Chloranthus holostegius*, espèce végétale utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise, deux nouveaux sesquiterpénoïde dimériques ont été isolés, les chlorahololides A et B (structures 28-29). Les molécules ont été décrites comme inhibitrices ou modulatrices des canaux de K^+ dans les cellules avec des CI_{50} de 10,9 et de 18,6 μM respectivement [Yang *et al.*, 2007].

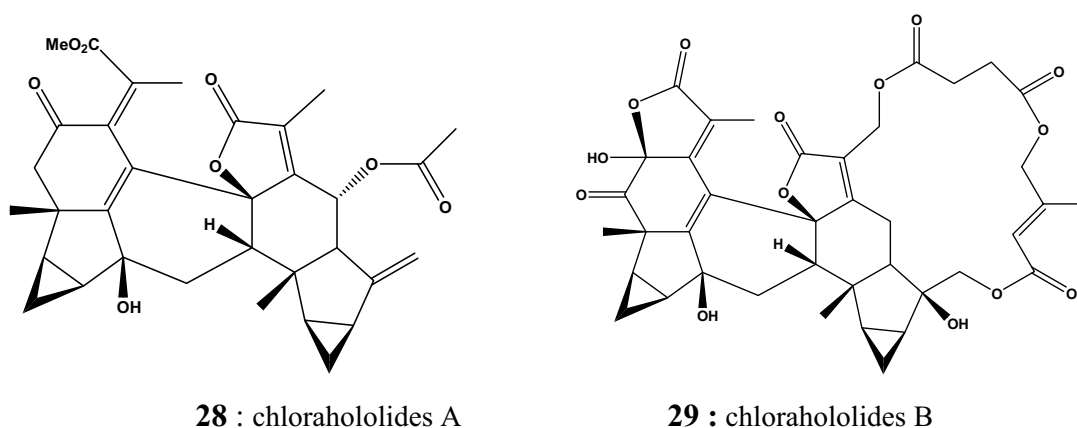


Figure 17.- Structures isolées de C. holostegius

Enfin, de l'espèce *Chloranthus henryi*, deux molécules ont été isolées et identifiées, le dayejijiol (sesquiterpène) et le (13S)-13-hydroxy-19-méthoxy-5aH-8(17),14-labdadiène (diterpénoïde de type labdane) (structures 30-31) et aussi des lactones sesquiterpéniques déjà connues : la chloranthalactone A, le shizukanolide et le shizukolidol. Toutes ces molécules ont été testées sur des cultures de cellules Hela (human cervical squamous carcinoma cell). En effet, le dayejijiol montre un CI_{50} de $5,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ suivie par le shizukanolide avec un CI_{50} de $17,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ [Wu *et al.*, 2007].

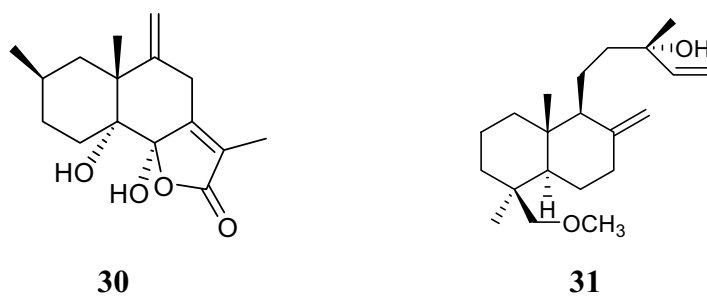


Figure 18.- Structures du dayejijiol et de (13S)-13-hydroxy-19-méthoxy-5aH-8(17),14-labdadiène isolées à partir de C. henryi

4.- Généralités sur les parasites de *Leishmania*

Nous allons ici développer la description du genre *Leishmania sp.*, les symptomatologies induites par ces parasites ainsi que les thérapeutiques actuelles et à venir.

4.1.- Historique

Le parasite *Leishmania* fut observé par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort à Dum-Dum en Inde. En 1903, Charles Donovan, en poste dans un service médical indien, identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* en leur hommage [Roberts *et al.*, 2000]. Ce même parasite fut étudié en 1903 par Wright chez un enfant arménien vivant à Boston, aux Etats-Unis, et les nombreuses similitudes au point de vue morphologique entre ces deux parasites (Leishman-Donovan et celui de Wright) ne sont pas contestables [Dedet, 1999].

La relation entre le vecteur (phlébotome) et les symptômes est due à l'équipe de l'Institut Pasteur d'Algérie dirigé à l'époque par les frères Edmond et Etienne Sergent et leurs collaborateurs. Les preuves expérimentales de la transmission de la leishmaniose cutanée ont été apportées en 1921, lorsque les frères Sergent contaminèrent un sujet sain en le faisant piquer par des phlébotomes récoltés dans le sud du pays. Presque parallèlement, des observations faites en Palestine et en Syrie par Adler et Theodor confirmèrent celles de l'équipe de l'Institut Pasteur d'Algérie [Dedet, 1999].

4.2.- Identification et taxonomie des parasites du genre *Leishmania*

Les agents responsables de cette maladie parasitaire qui appartiennent à la famille des Trypanosomatidae et à l'ordre des Kinetoplastida. Depuis la description du genre *Leishmania* par Ross, en 1903, différentes classifications ont été proposées, dont celle ci-dessous proposée par Levine et collaborateurs en 1980 [Botero, 2006; Dedet, 1999; Roberts *et al.*, 2000] (tableau 3).

Classification du genre *Leishmania*

Règne :	Protista
Sous-règne :	Protozoa
Embranchement :	Sarcomastigophora
Classe :	Zoomastigophorea
Ordre :	Kinetoplastida
Sous-Ordre :	Trypanosomatina
Famille :	Trypanosomatidae
Genre :	<i>Leishmania</i>

Tableau 3.- Position systématique du genre *Leishmania*

Le développement du parasite dans le tube digestif du vecteur, au niveau du pylore est le critère qui a permis de diviser le genre *Leishmania* en deux sous-genres. D'une part, la section suprapylaria, caractérisée par la multiplication dans l'intestin moyen et antérieur, devient le sous-genre *Leishmania*. D'autre part, la section Peripylaria, caractérisée par la multiplication dans la partie postérieure suivie d'une migration antérieure, devient le sous-genre *Vannia* [Dedet, 1999; Botero, 2006].

Le genre *Leishmania* est composé de plusieurs espèces qui, bien qu'elles soient toutes de morphologie similaire, causent une panoplie de manifestations cliniques allant d'affections cutanées qui se résorbent d'elles-mêmes à des infections viscérales fatales en passant par des exacerbations inflammatoires causant de graves défigurations. On regroupe habituellement les espèces de *Leishmania* en « complexes » selon les similarités biochimiques (tableau 4).

Sous-genre	<i>Leishmania</i>	Espèces
Complexe :	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> ; <i>L. archibaldi</i>
Complexe :	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> ; <i>L. chagasi</i>
Complexe :	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> ; <i>L. killicki</i>
Complexe :	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
Complexe :	<i>L. gerbilli</i>	<i>L. gerbilli</i>
Complexe :	<i>L. arabica</i>	<i>L. arabica</i>
Complexe :	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>
Complexe :	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> ; <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. venezuelensis</i>
Complexe :	<i>L. enrietti</i>	<i>L. enrietti</i>
Complexe :	<i>L. hertigi</i>	<i>L. hertigi</i> ; <i>L. deanei</i>
Sous-genre	<i>Viannia</i>	
Complexe :	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. peruviana</i>
Complexe :	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i> ; <i>L. panamensis</i>

Tableau 4.- Espèces et sous-espèces du genre *Leishmania* [Roberts *et al.*, 2000]

4.3.- Distribution des différentes espèces de *Leishmania*

Les différents types de leishmanioses sont retrouvés dans les régions tropicales et subtropicales du globe. On distingue deux grandes situations géographiques, l'Ancien monde (sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient, Moyen-Orient et Asie) et le Nouveau monde (Amériques du Sud et Centrale) (tableau 5).

Espèce	Distribution géographique
Leishmaniose cutanée	
<i>L. aethiopica</i>	Éthiopie et Kenya
<i>L. major</i>	Afrique et Asie
<i>L. mexicana</i>	Amérique Centrale et du Sud
<i>L. tropica</i>	Europe, Asie, et Afrique du Sud
Leishmaniose mucocutanée	
<i>L. braziliensis</i>	Amérique Centrale et du Sud
<i>L. peruviana</i>	Amérique du Sud
Leishmaniose viscérale	
<i>L. chagasi</i>	Amérique du Sud
<i>L. donovani</i>	Afrique et Asie
<i>L. infantum</i>	Bassin Méditerranéen

Tableau 5.- Distribution géographique des différentes espèces de *Leishmania*

La distribution géographique des différentes espèces de *Leishmania* semble de plus très proche de celle des insectes vecteurs. Environ 30 espèces de mouches des sables jouent le rôle de vecteur et appartiennent soit au genre *Phlebotomus* (Ancien Monde) soit au genre *Lutzomyia* (Nouveau Monde). Ces insectes se distribuent en fonction de l'altitude et des facteurs climatiques généraux et, en particulier, la température et la pluviosité [Le Pont *et al.*, 1992; Menne, 2006].

Les pays les plus touchés par la leishmaniose viscérale, représentant 90% des cas mondiaux, sont le Bangladesh, le Brésil, l'Inde, le Népal et le Soudan. De même, 90% des cas mondiaux de leishmaniose cutanée sont recensés en Afghanistan, en Algérie, au Brésil, en Iran, au Pérou, en Arabie Saoudite et en Syrie. En ce qui concerne la leishmaniose mucocutanée, 90% des cas se trouvent au Pérou, en Bolivie et au Brésil (figure 19) [Desjeux, 1996, 2004; WHO, 2000].

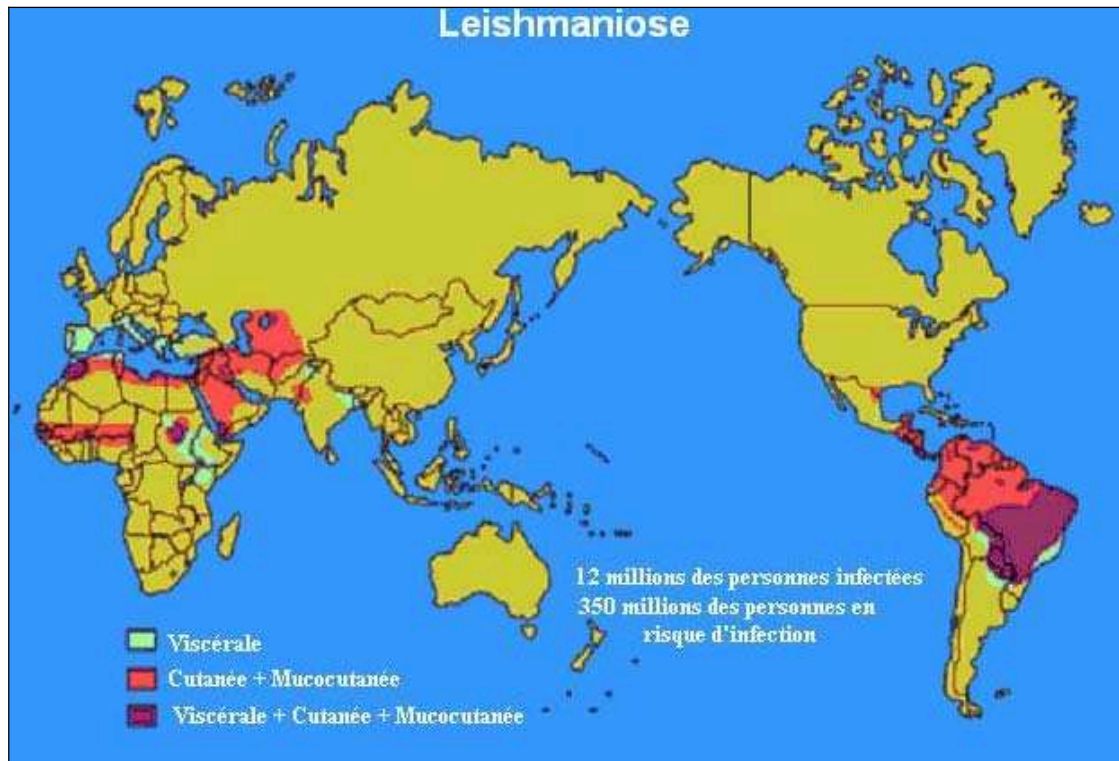


Figure 19.- Régions endémiques des cas de leishmaniose cutanée, muco-cutanée et viscérale
[Handman, 2001]

4.4.- Cycle de vie et morphologie de *Leishmania sp.*

Les leishmanies sont des parasites hétéroxènes et dimorphiques c'est-à-dire possédant deux formes morphologiques différentes au cours de leur cycle de vie : tout d'abord la forme promastigote lorsqu'il se développe chez l'insecte vecteur puis sous forme amastigote qui se développe à l'intérieur des macrophages chez l'hôte mammifère [Ouellette *et al.*, 2003; Vannier-Santos *et al.*, 2002] (figure 20).

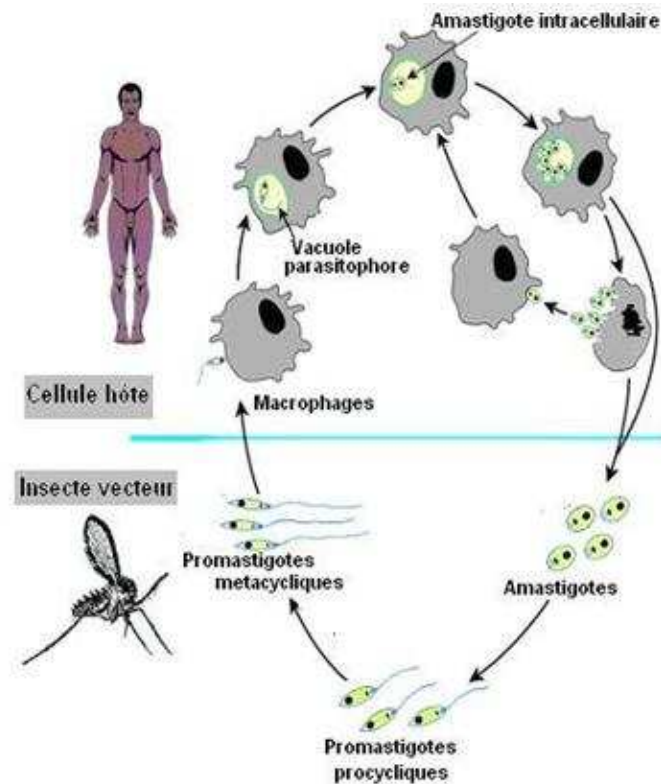


Figure 20.- Cycle de vie du parasite [Handman, 2001]

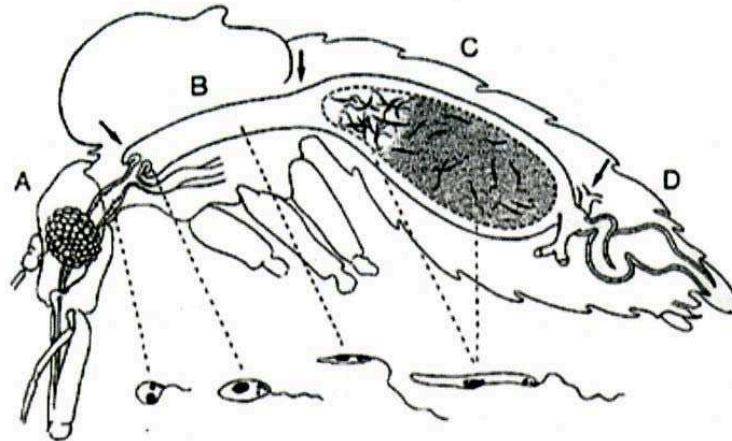
4.4.1.- Phase extracellulaire : développement chez l'insecte

Les parasites sous cette forme sont mobiles, extracellulaires et fusiforme de 5 à 20 μm de longueur et de 1 à 4 μm de largeur, prolongés par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20 μm de longueur et qui émerge de leur pôle antérieur [Dedet, 1999; Vannier-Santos *et al.*, 2002] (figure 22a). Selon l'espèce, la durée du cycle chez l'insecte varie entre 4 et 18 jours.

Au cours du repas sanguin sur un mammifère infecté, l'insecte vecteur femelle ingère des macrophages contenant des amastigotes qui se différencieront en promastigotes au bout de 24 heures. Ceux-ci se divisent activement sous une forme dite procyclique non infectieuse (24-48 heures après l'infection) puis ils deviennent très fuselés et sont alors connus sous le nom de nectomonades. Vers le 3^e jour après l'infection, les nectomonades vont se fixer aux microvillosités de l'intestin médian abdominal, et puis migrent vers l'intestin médian thoracique (4-5 jours).

A ce stade, deux voies de différenciation semblent empruntées, certains nectomonades deviennent haptomonades ovalaires lesquels donnent origine aux paramastigotes dont le rôle

exact n'est pas encore connu. D'autres nectomonades se transforment en promastigotes métacycliques, très infectieux, de forme allongée, flagellée et très mobiles, qui ne sont plus capables de se diviser. Migrant vers l'œsophage, le pharynx et le proboscis. Ils vont être injectés par l'insecte lors de son prochain repas sanguin [Dedet, 1999; Ouellette *et al.*, 2003; Sacks et Kamhawi, 2001; Sacks, 1989] (figure 21).



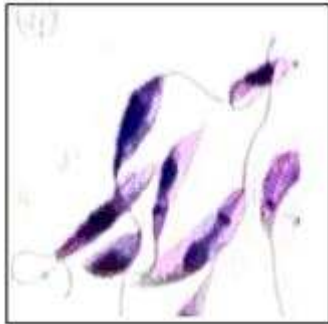
Processus par lequel les formes non infectieuses (procyclique) du stade promastigote de *Leishmania* se différencient en formes hautement infectieuses (métacycliques). Cette différenciation dure entre cinq et sept jours. Les formes métacycliques migrent vers le pharynx de l'insecte. Tête et pharynx (A), intestin médian thoracique (B), intestin médian abdominal (C), intestin postérieur (D). Le sang (zone grise en C) est entouré par la membrane péritrophique.

Figure 21.- Processus de différenciation au niveau de tube digestif chez le vecteur
[Schlein, 1993]

4.4.2.- Phase intracellulaire : développement chez l'hôte mammifère

Les amastigotes sont des parasites intracellulaires de forme ronde ou ovale d'environ 4 μm de long et 2 μm , de large, possédant un flagelle très court [Dedet, 1999] (figure 22b). L'introduction des promastigotes est effectuée par l'insecte vecteur lors son repas sanguin. Dans un premier temps, un signal émis par les promastigotes métacycliques permet aux macrophages dermiques de phagocyter les parasites. Le compartiment abritant ces derniers va subir des modifications jusqu'à aboutir à la formation d'organites connus comme vacuoles parasitophores (VP) ou phagolysosome. A ce stade, les promastigotes vont se différencier en amastigotes adaptés à la vie intracellulaire, l'achèvement de ce processus requiert entre 3 à 7 jours. Le changement de température de 25°C à 37°C [Garlapati *et al.*, 1999] et le changement de pH, (d'un pH physiologique à un pH aux environs de 5.0), induisent la différenciation en amastigotes. Les parasites après différenciation se divisent par fission binaire, et l'infection

chez les hôtes mammifères se répand par relargage et internalisation de macrophage à macrophage [Botero, 2006; Ouellette *et al.*, 2003].



A : Forme promastigotes chez l'insecte



B : Forme amastigotes chez les mammifères

Figure 22.- Morphologie chez les leishmanie : formes promastigotes et amastigote

5.- Epidémiologie sur la leishmaniose

5.1.- Chiffres alarmants

Actuellement, 20 espèces du genre *Leishmania* sont responsables de cette maladie et sont distribuées le long des régions tropicales et subtropicales sur 88 pays de quatre continents. Selon les données statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé, dans les régions endémiques 350 millions d'individus sont en risque d'infection, 12 millions de personnes sont atteintes et l'on recense entre 1,5 à 2 millions de nouveaux cas par an. Les formes cutanées de cette maladie touchent environ 1 à 1,5 millions de personnes chaque année et la forme viscérale 0,5 millions d'individus [Desjeux, 2001; Vannier-Santos *et al.*, 2002; WHO, 2002].

Dans différentes régions, l'augmentation des cas de leishmaniose a pris une ampleur importante, comme par exemple pour les cas de leishmaniose cutanée au Brésil où 21 800 individus étaient atteints en 1998, ce chiffre a augmenté en 2002 jusqu'à 40 000. La même pathologie à Kaboul en Afghanistan a touché 14200 personnes en 1994 et en 2002, on recense 65 000 cas. De même à Ouagadougou au Burkina Faso en 1995 ont été déclarés 28 cas et en 2000 le chiffre a augmenté pour atteindre 2 375. Pour la leishmaniose viscérale au nord du Brésil en 1998 il y a eu 1 840 cas et en 2002, 6 000 [Desjeux, 2004].

5.2.- Etudes épidémiologiques

La propagation des cas de leishmaniose est basée sur deux formes éco-épidémiologiques. Dans la première forme ou forme zoonotique, les mammifères sauvages ou domestiques (surtout le chien) interviennent en tant que réservoirs naturels, où l'être humain joue le rôle d'hôte facultatif lorsqu'il s'expose accidentellement au cycle de transmission. Ensuite, la deuxième forme ou forme anthroponotique est caractérisée par la présence d'un seul réservoir qui est aussi source d'infection : l'homme [Dedet, 1999; Desjeux, 2001, 2004; Ouellette *et al.*, 2003] (figure 23).

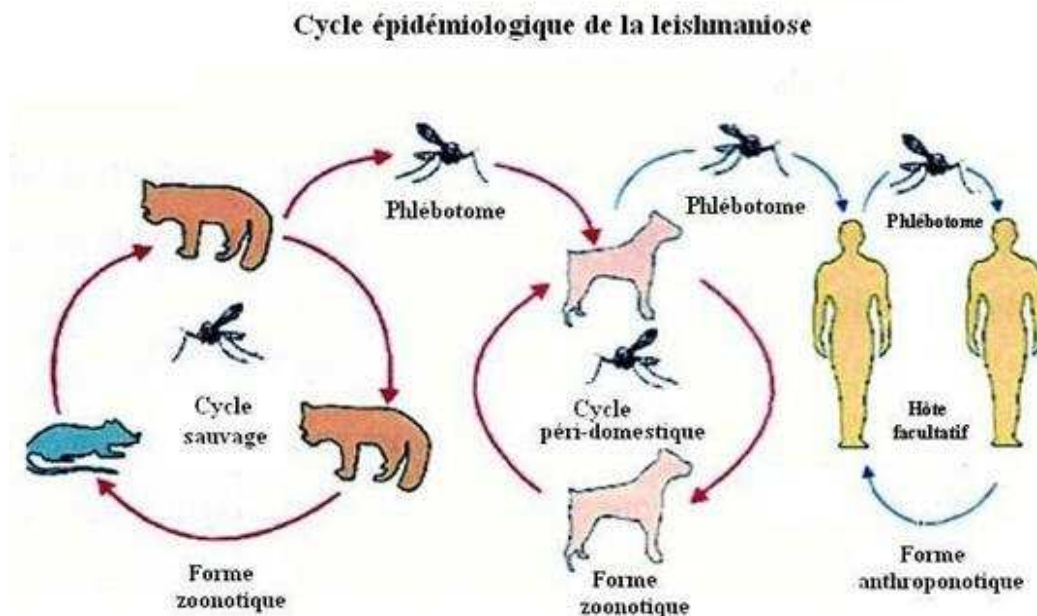


Figure 23.- Cycle épidémiologique de la leishmaniose [Unanleon]

5.3.- Cas de co-infection HIV/leishmaniose

Récemment l'apparition d'un chevauchement entre les régions d'infection par *Leishmania spp.* (surtout la forme viscérale), et celle d'infection par HIV (Human Immunodeficiency Virus) [Alvar *et al.*, 1997; Desjeux, 2001] permet d'observer une augmentation des cas de co-infection dans 35 pays, répartis entre le sud de l'Asie, l'Afrique sub-saharienne, le sud de l'Europe et l'Amérique du sud (figure 24) [Cruz *et al.*, 2006]. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 2 000 cas de co-infection ont été rapportés sur le bassin Méditerranéen dont 90% se retrouvent surtout en Espagne, en Italie, en France et au Portugal [Cruz *et al.*, 2006; Desjeux, 2001].



Figure 24.- Distribution des cas de co-infection HIV/Leishmania (l'Amérique du Sud, le bassin méditerranéen, l'Afrique ainsi que l'Inde sont les régions les plus touchées)
 (http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index1.html)

5.4.- Situation de la leishmaniose en Bolivie

La distribution géographique des cas de leishmanioses en Bolivie est semblable à celle du vecteur, qui se situe entre 270 et 2400 mètres d'altitude. Cette affection touche six départements sur neuf, au niveau des zones tropicales, sub-tropicales et s'étend jusqu'au vallées. La population à risque est estimée à 800 000 habitants. En 2000, on a recensé 1 735 cas, dont 84% sont atteints de leishmaniose cutanée et 16% sont des cas de leishmaniose mucocutanée [OPS/OMS, 2003; Sanchez, 2000] (figure 25).

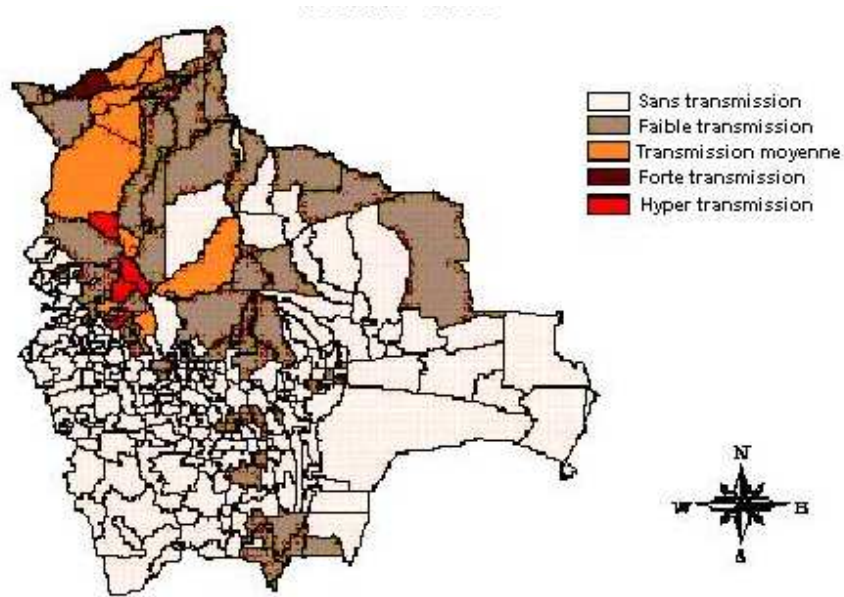


Figure 25.- Distribution épidémiologique par région et par niveau de risque, Bolivie 2005

D'autre part, entre 1996 et 2005, les cas de leishmanioses d'origine anthroponotique ne cessent d'augmenter (une moyenne de 2000 individus par an sont infectés) [Mollinedo *et al.*, 2000] (figure 26). Cette maladie touche plutôt les hommes (55%) entre 20 et 30 ans. Plus particulièrement des migrants des hauts plateaux qui migrent vers les terres basses et fondent de petits villages liés à l'exploitation agricole et aux activités de recherche pétrolière.

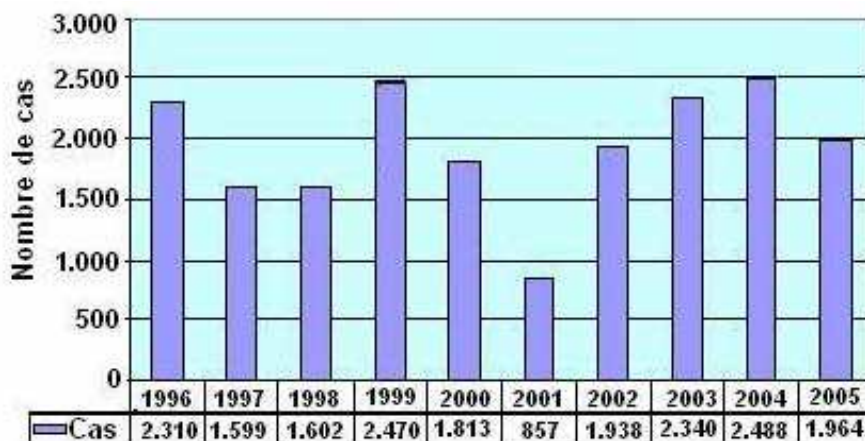


Figure 26.- Nombre de cas de leishmaniose recensés pendant la période 1996-2005

Dans les régions endémiques de la Bolivie, 120 espèces d'insectes diptère appartenant au genre *Lutzomyia* ont été identifiées dont 5 espèces sont liées directement à la transmission de la maladie (*L. longipalpis*, *L. nuneztovari anglesi*, *L. carrerai carrerai*, *L. yucumensis* et *L.*

llanosmartinsi), les réservoirs sauvages sont des rongeurs du genre *Oryzomys capito* et un putois des Andes (*Conepatus chinga rex*) [Mollinedo *et al.*, 2000].

D'une manière générale, la Bolivie connaît de graves problèmes en matière de santé en raison de la désarticulation géographique et sociale. Cela peut entraîner une marginalisation et une exclusion d'une partie importante de sa population. De plus, il est estimé que 25 % de la population, en zones rurales, ne possèdent aucune couverture sociale; le taux de couverture sanitaire est d'environ 60 % en zone urbaine et de 15 % en zone rurale.

6.- Manifestations cliniques de la maladie chez l'homme

Le parasite du genre *Leishmania* est, selon les espèces, responsable de différentes pathologies et représente une cause importante de morbidité et mortalité en médecine humaine et vétérinaire [Ouellette *et al.*, 2003]. Les manifestations symptomatiques peuvent être classées en quatre groupes [Desjeux, 1996, 2004].

Leishmaniose cutanée (LC), cette manifestation clinique était autrefois appelée bouton d'Orient, elle se caractérise par la formation d'une petite papule prurigineuse rouge sombre qui apparaît au site de piqûre. Puis, elle s'ulcère, s'infiltré en profondeur et se recouvre de une mince croûte évoluant très lentement sous forme sèche ou forme humide. Le tout se résorbe généralement après quelques mois voire un an, en laissant, malheureusement, de profondes cicatrices non pigmentées. Dans le cas de *L. mexicana*, les lésions guérissent spontanément sauf lors d'une infection au niveau du pavillon de l'oreille qui peut durer plusieurs années (certaines datent de 40 ans) connu comme « ulcéra del chiclero » (figure 27) [Dedet, 1999; Desjeux, 1996; Roberts *et al.*, 2000].



Lésion pavillon oreille



Lésion ulcérate visage

Figure 27.- Lésions ulcérate de la leishmaniose viscérale

Leishmaniose cutanéomuqueuse ou mucocutanée (LCM), connue sous le nom d'espundia, il s'agit d'une zoonose où les manifestations cliniques, de façon générale, évoluent en deux temps : d'une part, l'apparition d'ulcères cutanés initiaux, similaires à la leishmaniose cutanée, qui finissent par se résorber spontanément entre six mois et un an. D'autre part, une deuxième infection peut s'installer avant la guérison de la première ou apparaître plusieurs années plus tard. Elle provoque des lésions pouvant conduire à une destruction étendue et mutilante des muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge. Ces lésions nécrosées peuvent entraîner des infections bactériennes et le tout peut engendrer une grande difformité due à la perte des lèvres, nez, palais et pharynx. La mort du patient peut également survenir à cause d'infections secondaires ou de problèmes de respiration (figure 28) [Desjeux, 1996; Roberts *et al.*, 2000].



Figure 28.- Lésions mucocutanées

Leishmaniose cutanée diffuse (LCD), est caractérisée par la dissémination des lésions nodulaires ou en plaque qui ressemblent fortement à des formes lèproïdes, souvent présentes au niveau de visage ou des membres. Ces lésions ne guérissent pas de façon spontanée et sont plus fréquentes chez des individus ayant un système immunitaire défectueux (figure 29).



Figure 29.- Leishmaniose cutanée diffuse

Leishmaniose viscérale (LV), également appelée kala-azar, un mot indien signifiant fièvre noire. Représente la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité d'environ 100% en l'absence de traitement. Les parasites ne restent pas au site de piqûre, ils migrent vers les organes lymphoïdes (le foie, la rate et la moelle osseuse), via les systèmes sanguin et lymphatique. Elle se caractérise par des poussées de fièvre irrégulières, une perte de poids, une hépato-splénomégalie, une lymphoadénopathie et une anémie. La mort survient chez les patients non-traités de 6 mois à quelques années suivant l'infection (figure 30) [Roberts *et al.*, 2000].



Figure 30.- Enfant atteint de leishmaniose viscérale

7.- Méthodes de Diagnostic

Le diagnostic des leishmanioses repose sur deux méthodes différentes, la première méthode, dite directe et la deuxième, la méthode indirecte.

7.1.- Méthodes directes

Microscopie :

Deux cas de figure sont envisageables : le cas des leishmanioses cutanées et mucocutanées et le cas des leishmanioses viscérales. Dans le premier cas, on effectue un frottis provenant des lésions ulcéreuses ; dans le second cas, on a recours à un frottis à partir d'une ponction du foie, de la rate, de la moelle osseuse ou des ganglions lymphatiques [Guerin *et al.*, 2002].

Culture :

Pour révéler la présence des parasites et augmenter leur nombre, car l'identification des amastigotes au microscope n'est pas toujours possible. Le prélèvement des échantillons se réalise soit au niveau des lésions cutanées, soit par ponctions des organes lymphoïdes, et

peuvent être mis en culture dans des milieux riches tel que le NNN (Novy-McNeal-Nicolle) [Roberts *et al.*, 2000].

7.2.- Méthodes indirectes

D'autres méthodes sont utilisées telles que les méthodes sérologiques et moléculaires.

Méthodes Sérologiques :

Elles sont basées sur l'identification des anticorps sériques. On utilise principalement trois tests : le test **ELISA** (*Enzyme linked immunosorbent assay*) et le test d'Immunofluorescence (**IFAT**), qui sont les plus sensibles et spécifiques surtout en ce qui concerne la leishmaniose viscérale [Guerin *et al.*, 2002]. Le test *d'agglutination directe* (**DAT**), quant à lui, est bien adapté aux situations de terrain [Boelaert *et al.*, 1999b]; malheureusement, l'antigène utilisé n'est pas très stable ce qui affecte la reproductibilité [Boelaert *et al.*, 1999a]. Une dernière méthode sérologique expérimentale mise au point récemment et utilisée en Inde est **l'immuno-chromatographie** avec un antigène recombinant (rK39) [Bern, 2000]. C'est une méthode très sensible et spécifique [Sundar *et al.*, 1998]. Toutes les méthodes sérologiques ne sont pas très utiles à la détection de leishmaniose cutanée à cause du faible taux d'anticorps produits mais conviennent à la leishmaniose viscérale et muco-cutanée [Desjeux, 2004].

Méthodes moléculaires :

L'identification d'ADN de parasite par réaction de polymérisation en chaîne (**PCR**) est basée sur l'amplification de séquences d'ADN ou ARN. Cette méthode est généralement plus sensible que les méthodes sérologiques, pouvant détecter la présence d'un seul parasite [Salotra *et al.*, 2001].

8.- Taxonomie et morphologie du vecteur

Les vecteurs de transmission de la leishmaniose sont des insectes qui appartiennent à l'ordre Diptera, à la famille des Psychodidae et à la sous-famille des Phlebotominae, comportant environ 700 espèces. Seuls les genres *Lutzomyia* et *Phlebotomus* se trouvent impliqués dans l'épidémiologie des leishmanioses, le premier se subdivise en 16 sous-genres et le second en 8 [Dedet, 1999]. Les insectes du genre ***Phlebotomus*** se situent dans les régions sub tropicales, arides et semi-arides de l'Asie, de l'Afrique et du sud de l'Europe,

ceux du genre *Lutzomyia* sont présents dans les régions tropicales et sub tropicales de l'Amérique [Killick-Kendrick, 1990].

Ses insectes sont petits, ils n'excèdent pas 3 mm de long, possèdent un corps grêle et allongé, leurs couleurs s'étendent du blanc au noir. Seules les femelles sont hématophages (nécessaire à la ponte des œufs) et responsables de la transmission de la leishmaniose [Pinto *et al.*, 2001] (figure 31). Leur durée de vie est fonction de la température et de l'humidité, en moyenne les femelles vivent entre deux semaines et deux mois [Dedet, 1999].



Figure 31.- Phlébotome vecteur [www.algerie-dz.com]

8.1.- Contrôle des réservoirs et des vecteurs

Les mesures de prévention ayant pour but la diminution de la propagation de la maladie doivent se baser sur le contrôle de la transmission zoonotique et de la transmission anthroponotique.

Dans la **transmission zoonotique**, il est conseillé d'éviter le contact avec le vecteur, ce dernier est plutôt actif après le coucher du soleil et pendant la nuit dans les régions chaudes.

De plus, il faut mettre en place des techniques de prophylaxie, telles que l'application d'insecticides péri ou intra domiciliaires (utilisation courante de Pyréthroïde), et aussi l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide [Desjeux, 2004]. Ces moyens de prévention (application d'insecticides maison et moustiquaires), ont été prouvés comme moyens de contrôle efficaces pour des *focii* de leishmaniose cutanée en Afganistan, Syrie, et pour la leishmaniose viscérale au Népal et au Soudan [Bern, 2000].

En outre, des études concernant la protection des chiens grâce à l'imprégnation des colliers avec de la deltaméthrine, montrent une efficacité prometteuse [Desjeux, 2004; Gavvani *et al.*, 2002; Killick-Kendrick *et al.*, 1994]. De plus, l'amélioration des systèmes de diagnostic, de surveillance et de traitement des chiens malades semble nécessaire.

Dans la **transmission anthroponotique**, il est conseillé d'améliorer les systèmes de surveillance, de diagnostic précoce et le suivi des cas de résistance. Cela dans le but d'éviter la propagation de la maladie surtout vers les régions non endémiques [Desjeux, 2004].

9.- Traitements contre les leishmanioses

L'antimoine trivalent fût la première molécule utilisée mais elle a été vite abandonnée à cause de sa toxicité. Depuis 1940, les médicaments de première ligne les plus utilisés sont des antimoine pentavalents, le N-méthyl glucamine (**Glucantime®**) avec une teneur d'antimoine de 8.5% (85 mg/ml) et le stibogluconate de sodium (**Pentostam®**) dont la teneur en antimoine est de 10% (100 mg/ml). Ces produits ont une action inhibitrice sur la synthèse de l'ADN, sur l'oxydation glycolytique et sur celle des acides gras, de plus ils ne sont actifs *in vivo* qu'après conversion en antimoine trivalent [Dedet, 1999; WHO, 2002].

Ces traitements ont plusieurs désavantages, d'une part le patient doit être hospitalisé car l'administration intraveineuse ou intramusculaire est échelonnée entre 20 à 28 jours [Berman, 2003]. D'autre part, ces médicaments montrent plusieurs effets secondaires qui peuvent être regroupées en deux catégories : des signes de stibio-intolérance et/ou des signes de stibio-intoxication. Les premiers se manifestent dès les premières injections et sont de type anaphylactique comme des douleurs musculaires, des éruptions cutanées, des vomissements, de l'hyperthermie, tachycardie et des hémorragies. Les autres surviennent en fin de cure et se traduisent par des signes généraux, des troubles cardiaques, hépatiques, pancréatique, rénaux et hématologiques [Dedet, 1999]. De plus, le problème majeur est la résistance qui commence à émerger chez les parasites. En effet, dans la province du Bihar en Inde, où la leishmaniose viscérale est endémique, 65% des nouveaux cas sont dus à des souches résistantes [Lira *et al.*, 1999; Sundar, 2001]. Sur le continent américain, certaines souches responsables de la leishmaniose cutanée et mucocutanée montrent également des résistances à ces médicaments [Grogl *et al.*, 1992].

Dans les cas où ces médicaments ne sont pas efficaces, les traitements de deuxième intention sont l'**Amphotéricine B** et la **pentamidine**.

L'Amphotericine B est un antibiotique, un polyénique, puissant antifongique utilisé dans le traitement des mycoses systémiques, et qui inhibe l'ergostérol provoquant des modifications de la perméabilité de la membrane parasitaire. Cette molécule est utilisée surtout dans le cas de la leishmaniose viscérale [Dedet, 1999].

Ce médicament est très efficace avec un taux de guérison de 97% et aucune résistance n'a encore été rapportée [Thakur *et al.*, 1996]. L'administration s'effectue par perfusion intraveineuse. Malheureusement elle montre des effets toxiques rénaux et hématologiques non négligeables. Pour diminuer cette toxicité, certaines formulations lipidiques d'Amphotéricine B ont été élaborées, comme par exemple des liposomes, des dispersions colloïdales ou des complexes lipidiques. Les liposomes (**AmBisome**[®]) sont les plus efficaces (une dose de 15 mg/kg permet un taux de guérison de 95% sur des patients atteints de LV, [Berman, 2003] et les moins toxiques mais les coûts extrêmement élevés de l'ensemble de ces produits ne permettent pas leur usage dans les pays en voie de développement [Guerin *et al.*, 2002].

La **pentamidine**, est une diamine aromatique synthétisée qui inhibe la synthèse de l'ADN parasitaire par blocage de la thymidine synthétase et par fixation sur l'ARN de transfert. L'administration se fait par perfusion lente, et les effets toxiques dépendants de la dose, apparaissent au cours du traitement atteignant le rein, le pancréas ou les lignées sanguines [Dedet, 1999]. La pentamidine à des doses faibles de 4mg/kg n'a montrée qu'un taux de guérison modéré de 74%. Afin d'atténuer ses effets toxiques, la pentamidine a été testée en alternance avec l'**allupurinol** (2mg/kg de pentamidine pendant 30 jours en combinaison avec l'allupurinol à 15 mg/kg/jours), le taux de guérison obtenu fut bien plus important, de l'ordre de 90% [Berman, 2003].

Récemment, de nouveaux produits montrent des résultats très intéressants. Tout d'abord la **Miltéfosine**, un hexadécylphosphocholine, dont on ne connaît pas avec exactitude le mode d'action mais qui est supposé agir sur la biosynthèse de la phosphatidylcholine, les signaux de transduction et la homostase du calcium [Croft et Coombs, 2003]. Cette molécule qui est un agent antinéoplasique vient d'être approuvée en Inde. Son grand avantage, par

rapport aux autres produits, est qu'elle est administrée oralement à une dose de 2,5 mg/kg/jours pendant 28 jours avec 98% de succès, de plus elle montre des effets secondaires négligeables [Berman, 2003]. Après des essais cliniques en Phase IV, le gouvernement indien a décidé de l'utiliser comme traitement de première ligne depuis 2002 pour traiter surtout la leishmaniose viscérale [Carvalho et Ferreira, 2001; Croft *et al.*, 2005; Ganguly, 2002]. La miltéfosine a été utilisée en Colombie, avec un taux de guérison de 94% (Berman 2003). Cette même molécule a fait l'objet d'une étude en Bolivie avec un taux de guérison de 71% sur des patients atteints de LV [Soto *et al.*, 2007].

La **Paromomycine**, quant à elle, est un antibiotique aminoglycosidique qui inhibe les fonctions de la mitochondrie ainsi que celles des ribosomes, elle est administrée par voie parentérale dans des régions où la résistance aux antimoniés est très forte. De plus, des études sur l'efficacité des combinaisons entre la paromomycine et des antimoniés, ont été effectuées en Inde avec 94% de réussite (la dose testée était de 18 mg paromomycine/kg/jour et 20 mg antimoine/kg/jour pendant un période de 21 jours) [Berman, 2003]. Des formulations conditionnées sous forme de crème ont été testées (15% de Paromomycin et 0,5 % de gentamicine) en Colombie sur des patients ayant des lésions cutanées avec un taux de succès de 64% [Croft et Coombs, 2003].

D'autre part, la **Sitamaquine** ou dérivé 8-aminoquinoline a été développée par GlaxoSmithkline et le Walter Reed Army Institute of Research pendant la deuxième guerre mondiale. Ce composé est un analogue de la primaquine qui est administré oralement. Des essais cliniques en Phase II ont été complétés. Une première étude réalisée au Kenya a montré une diminution encourageante de la parasitémie (dose entre 0,75 – 1 mg/kg/jours pendant 28 jours) [Berman, 2005]. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude en Phase II montrant une efficacité de 83 % sur 95 patients atteints de LV au Kenya. Ces études ont démontrés des effets secondaires au niveau rénal à des doses entre 2,5 mg/kg/jour et 3,0 mg/kg/jour [Wasunna *et al.*, 2005]. Résultats aussi confirmés par une autre étude réalisée sur des patients atteints de LV en Inde, avec 87% de succès. Par contre des essais cliniques effectués au Brésil n'ont montré aucune efficacité et de plus des effets néphrotoxique ont été confirmés à doses entre 2,5 mg/kg/jour à 3 mg/kg/jour. [Jha *et al.*, 2005].

L'imiquimod, une imidazoquinoline qui induit la production d'oxyde nitrique, est utilisé dans les formulations des crèmes pour les verrues génitales. Comme une concentration trop élevée de NO est toxique pour les parasites, des études sur l'administration orale de ce médicament ont montré de taux de guérison de 60% à une dose de 5mg/kg (test *in vivo* sur des souris parasitées avec de *L. donovani*) [Croft et Coombs, 2003]. Ce médicament a été testé topiquement en combinaison avec des antimoine montrant un incrément sur le temps de guérison des patients atteints de LC [Berman, 2005]. Ce médicament est actuellement en phase II de tests cliniques [Croft *et al.*, 2006].

Finalement, le **Fluconazole**, administré de façon orale également, serait efficace et plutôt bien tolérée contre la leishmaniose cutanée causée par *L. major* [Alrajhi *et al.*, 2002].

9.1.- Prix des médicaments contre les leishmanioses

Les traitements de première ligne sont chers, plus spécialement en ce qui concerne la leishmaniose viscérale. Par exemple, le stibogluconate de sodium sous forme générique coûte environ 30 US \$, alors que son équivalent de marque coûte environ 150 US \$, l'antimoniote de méglumine coûtant quand à lui 120 US\$. Dans le cas des résistances aux antimoniés, un composé comme l'amphotéricine B coûte 60 US\$, alors que la pentamidine coûte 70 US \$. Les nouveaux médicaments comme l'amphotéricine B sous forme de liposomes coûte 120 US \$, le coût de la miltéfosine est d'environ 50 US \$ [Desjeux, 2004].

Le coût de ces traitements, très élevés pour la majorité des populations contaminées, rend la progression de la maladie plus facile.

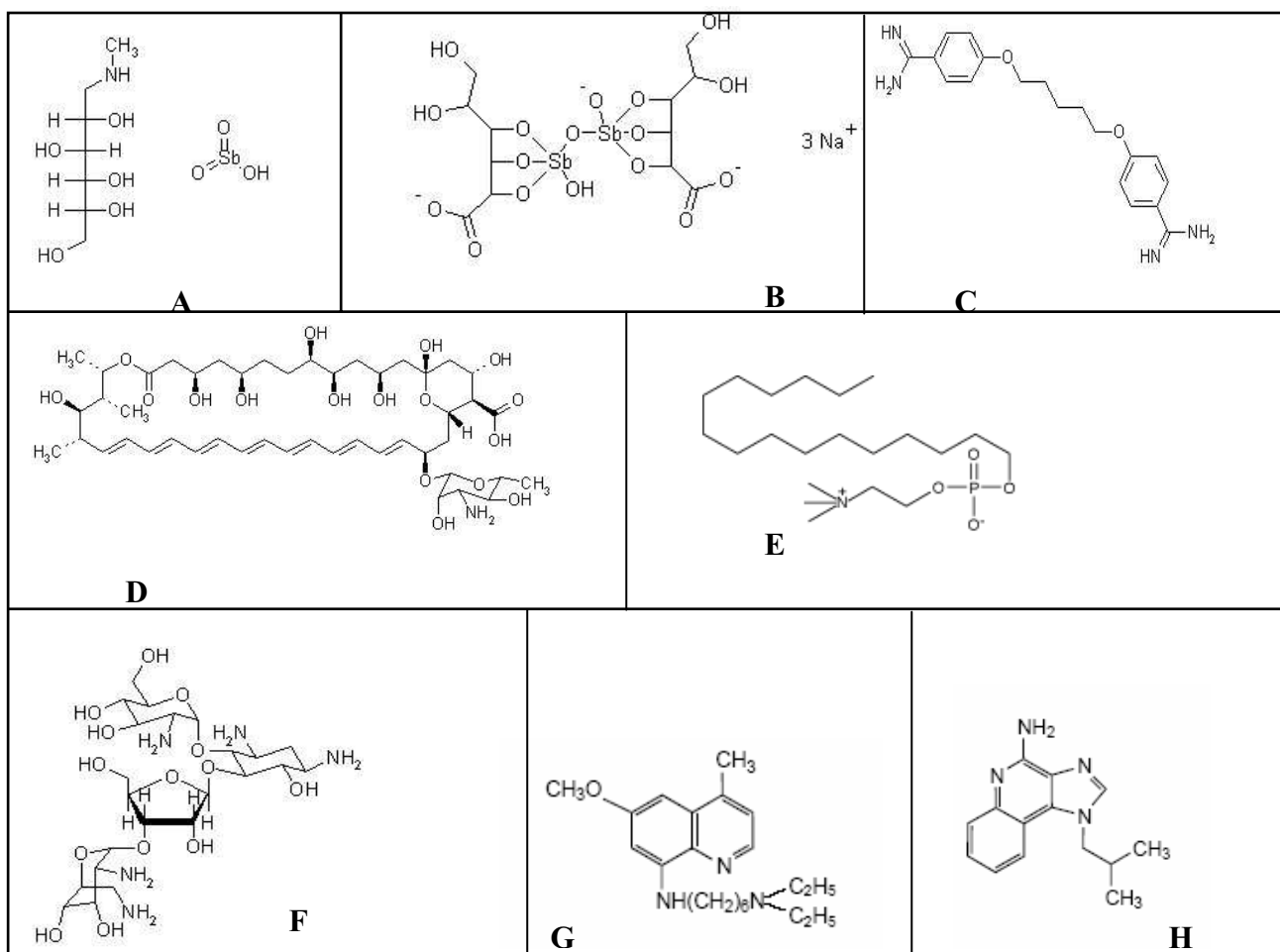


Figure 32.- Structures des différents médicaments utilisés actuellement :

A : Glucantime®) ; B : Stibogluconate de Sodium; C : Pentamidine iséthionate ;
D : Amphotericine B ; E : Miltefosine ; F : Paromomycine ; G : Sitamaquine ; H : Imiquimod

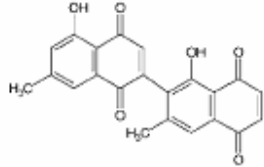
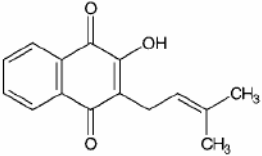
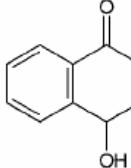
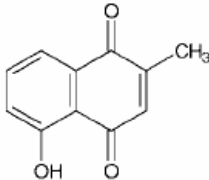
9.2.- Recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques contre les leishmanioses

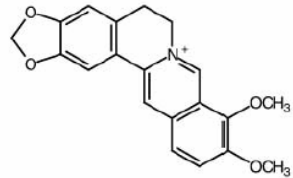
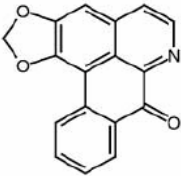
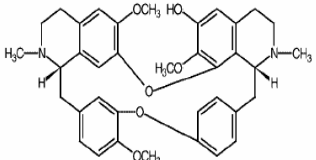
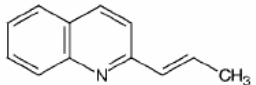
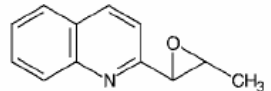
La médecine traditionnelle joue un rôle significatif dans le processus de découverte de nouvelles thérapeutiques. Les plantes offrent une source de molécules actives contre plusieurs protozoaires responsables de différentes maladies, comme par exemple le cas de la quinine, alcaloïde antipaludéen issue du genre *Cinchona*. Ensuite, nous pouvons remarquer le cas d'une lactone sesquiterpénique antipaludéenne, l'artémisinine, qui est obtenue du genre *Artemisia* ainsi que l'émetine, un alcaloïde actif contre les amibiases issu du genre *Cephaelis* [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001; de Carvalho et Ferreira, 2001; Fournet et Munoz, 2002].

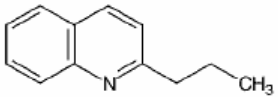
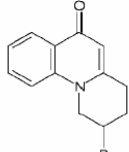
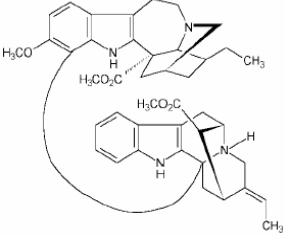
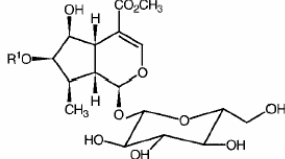
De plus, les produits naturels nous offrent la possibilité de découvrir des structures nouvelles et originales qui sont à la fois actives et sélectives, pouvant jouer le rôle de tête de série dans un processus d'optimisation. Dans cette optique, l'hémisynthèse à partir de molécules actives issues de plantes peut permettre de baisser la toxicité et d'augmenter la biodisponibilité.

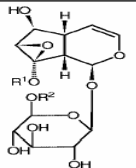
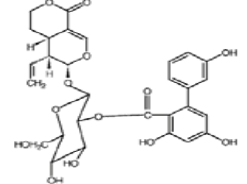
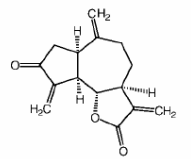
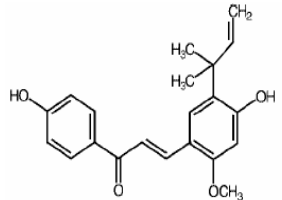
La recherche de molécules bio-actives ou de métabolites secondaires commence par le screening d'extraits bruts de plantes, suivi d'un fractionnement bioguidé, aboutissant à l'isolation et l'identification des molécules responsables de l'activité. Les évaluations antileishmaniennes préliminaires commencent par le screening sur les formes promastigotes et sur les formes amastigotes axéniques. Des tests plus poussés sur des formes intra macrophagiques sont faits sur les molécules actives isolées [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001].

Dans le tableau 6 sont résumés les principaux résultats décrits dans la bibliographie concernant l'activité antileishmanienne des molécules d'origine naturelle.

Famille et espèce végétale	Famille chimique et nom de la molécule	Tests développés et mécanisme d'action	Structure
Ebenaceae : <i>Dyospyros montana</i>	Quinone : Diospyrine	<p>In vitro : actif sur promastigotes de <i>L.donovani</i> avec une concentration inhibitrice minimale (MIC) de 1 µg/mL. Cette activité n'est pas sélective sur la phase intramacrophagique.</p> <p>Mécanisme : Inhibition de l'activité catalytique de l'enzyme Topoisomerase I [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001]</p>	
Bignoniaceae : <i>Tabebuia impetiginosa</i> .	Quinone : Lapachol	<p>In vitro : actif sur des amastigotes intramacrophagiques de <i>L. braziliensis</i></p> <p>Oralement : sur des hamsters infectés avec <i>L. braziliensis</i> n'empêcha pas la formation d'ulcères à une dose de 300 mg/kg/jour pendant 42 jours.</p> <p>La différence d'activité est peut être due à la métabolisation du lapachol en métabolite inactif</p> <p>Mécanisme : Production de radicaux oxygénés [Fournet et Munoz, 2002]</p>	
Ulmaceae : <i>Ampelocera edentula</i>	Quinone : 4-hydroxy-1-tétralone	<p>In vitro : actif sur promastigotes de <i>L.donovani</i>, <i>braziliensis</i> et <i>amazonensis</i> (CI₉₀ = 10 µg/mL)</p> <p>Administration subcutanée : actif sur des souris infectées avec <i>L.amazonensis</i> et <i>venezuelensis</i> à 25mg/kg/jour (activité semblable au Glucantime® 56 mgSb^V/kg/jour).</p> <p>In vivo : administré proche du point de piqûre, plus actif que le Glucantime® (50mg/kg/jour vs. 112 mgSb^V/kg/jour respectivement). Test réalisé sur des souris infectées avec <i>L.amazonensis</i>.</p> <p>Ce composé montre des activités cytotoxique, carcinogénique et mutagénique. [Fournet et Munoz, 2002]</p>	
Euphorbiaceae: <i>Pera benensis</i>	Naphthoquinone : Plumbagine	<p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L.braziliensis</i>, <i>donovani</i> et <i>amazonensis</i> (CI₉₀ = 5 µg/mL)</p> <p>In vitro : actif sur des amastigotes de <i>L.amazonensis</i> et <i>donovani</i> avec une CI₅₀ de 0,42 et 1,1 µg/mL respectivement. De plus, à 10 µg/mL l'indice de survie (SI) des parasites est de 16,5% et à cette concentration il est remarqué une absence de toxicité sur les macrophages.</p> <p>In vivo : activité détectable à 2,5 mg/kg/jour sur <i>L.amazonensis</i> et 5 mg/kg/jour sur <i>L.venezuelensis</i></p> <p>Mécanisme : production de radicaux oxygénés [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001]</p>	

<p>Annonaceae, Berberidaceae et Minespermaceae</p>	<p>Alcaloïde : isoquinoléine : Berberine</p>	<p>In vitro : actif sur plusieurs espèces de <i>Leishmania</i> à une concentration de 10µg/mL In vitro : actif sur les amastigotes de <i>L. major</i> qui infectent des macrophages intrapéritonéaux de souris à une concentration effective CE₅₀ = 10µg/mL. In vivo : faiblement actif en application cutanée sur lésions ulcératives de leishmaniose cutanée [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001; Kayser <i>et al.</i>, 2003]</p>	
<p>Annonaceae : <i>Annona</i> <i>spinescens</i> <i>Rollinia</i> <i>emarginata</i></p>	<p>Alcaloïde : isoquinoléique: Liriodenine</p>	<p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. donovani</i>, <i>braziliensis</i> et <i>amazonensis</i> avec un IC₁₀₀ = 100µg/mL (<i>A. spinescens</i>) In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. donovani</i>, <i>braziliensis</i> et <i>amazonensis</i> avec un IC₁₀₀ = 5µg/mL (<i>R. emarginata</i>) (2 résultats différents pour la même molécule) [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001]</p>	
<p>Hernandiaceae : <i>Gyrocarpus</i> <i>americanus</i></p>	<p>Alcaloïde : Bisbenzyl- isoquinoléines : Gyrocarpine</p>	<p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. donovani</i>, <i>braziliensis</i> et <i>amazonensis</i> à 10µg/ml In vivo presque aussi actif (100mg/kg/j) que le Glucantime® (56mg/kg/j) sur des souris infectées avec <i>L. amazonensis</i> [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001]</p>	
<p>Rutaceae : <i>Galipea longiflora</i></p>	<p>Alcaloïdes : Quinoléine : Chimanine B</p>	<p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. braziliensis</i>, <i>amazonensis</i> et <i>donovani</i> avec un IC₉₀ = 25µg/mL (Glucantime® CI₉₀> 100µg/mL) [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001; Fournet <i>et al.</i>, 1994b]</p>	
<p>Rutaceae : <i>Galipea longiflora</i></p>	<p>Alcaloïdes : Quinoléine : Chimanine D</p>	<p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. braziliensis</i>, <i>amazonensis</i> et <i>donovani</i> avec un IC₉₀ = 25µg/mL (Glucantime® CI₉₀> 100µg/mL) Subcutanée : à une dose de 0,54 mmol/kg/jour/pendant 10 jours inhibe 86,6 % des parasites dans le foie de souris BALB/c infectées avec <i>L. donovani</i> (Glucantime® à 56 mg/kg/jour pendant 10 jours inhibe 97,4%) [Fournet <i>et al.</i>, 1994b; Fournet <i>et al.</i>, 1994c; Fournet et Munoz, 2002]</p>	

<p>Rutaceae : <i>Galipea longiflora</i></p>	<p>Alcaloïdes : Quinoléines : 2-<i>n</i>-propyl quinoline</p>	<p><i>In vitro</i> : actif sur des promastigotes de <i>L. braziliensis</i>, <i>amazonensis</i> et <i>donovani</i> avec un $CI_{90} = 50\mu\text{g/mL}$ (Glucantime® $CI_{90} > 100\mu\text{g/mL}$) Oralement : à une dose de 0,54 mmol/kg/jour/pendant 10 jours inhibe 99,9% des parasites dans le foie de souris BALB/c infectées avec <i>L. donovani</i> (Glucantime® à 56 mg/kg/jour pendant 10 jours inhibition parasitaire de 89,8%) [Fournet <i>et al.</i>, 1994b; Fournet <i>et al.</i>, 1994c; Fournet et Munoz, 2002]</p>	
<p>Rutaceae : <i>Dictyoloma peruviana</i></p>	<p>Alcaloïdes : Dictyoloma A et B</p>	<p><i>In vitro</i> : produisent la lyse totale de promastigotes de <i>L. amazonensis</i> à 100$\mu\text{g/mL}$. Ils sont moins actifs sur <i>L. braziliensis</i> à la même concentration. Ces composés sont 10 fois moins actifs que la pentamidine ($CI_{100} = 5\mu\text{g/mL}$) [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001; de Carvalho et Ferreira, 2001]</p>	 <p>A R = $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ <i>cis</i> B R = $\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$</p>
<p>Apocynaceae : <i>Peschiera van heurkii</i></p>	<p>Alcaloïde : Bis-indole : Gabunine</p>	<p><i>In vitro</i> : actif sur promastigotes de <i>L. amazonensis</i> et <i>braziliensis</i> <i>In vitro</i> : actif sur des amastigotes de <i>L. amazonensis</i> à 25$\mu\text{g/ml}$ avec un Indice de Survie (IS) des parasites de 3% <i>In vivo</i> : ce composé n'est pas actif sur des tests <i>in vivo</i> peut être dû à une possible inactivation dans le hôte. [Akendengue <i>et al.</i>, 1999; Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001; de Carvalho et Ferreira, 2001]</p>	
<p>Oleaceae : <i>Nyctanthes arbortristis</i></p>	<p>Terpène 5 : Iridoïde :Arbortristoside A</p>	<p><i>In vitro</i> : actif sur des amastigotes de <i>L. donovani</i> Oralement actif sur des hamsters infectés avec <i>L. donovani</i> à 100 mg/kg/5jours Par voie intraperitonéale actif sur des hamsters infectés avec <i>L. donovani</i> à 100 mg/kg/5jours L'extrait montre une activité immunostimulante sur souris BALB/c [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001; de Carvalho et Ferreira, 2001]</p>	 <p>R¹ = <i>p</i>-methoxycinnamoyl</p>

<p><i>Picrorhiza kurroa</i></p>	<p>Terpenes : Iridoids : Picrolive</p> <p>Mélange prédéterminé entre picroside I (A) et kutkoside (B)</p>	<p>In vivo protège contre l'infection d'hamsters par <i>L. donovani</i>.</p> <p>Prévention des dommages hépatiques causés par la pentamidine</p> <p>Proposé comme adjuvant à fin d'augmenter l'efficacité des médicaments</p> <p>Augmentation de la réponse immune non spécifique</p> <p>[Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001]</p>	 <p>A R¹ = vanilloyl, R² = H B R¹ = H, R² = cinnamoyl</p>
<p>Gentianeae : <i>Swertia chirata</i></p>	<p>Terpenes : Iridoids : Amarogentine</p>	<p>In Vitro : actif sur <i>L. donovani</i> à une concentration de 30 µM</p> <p>Topoisomérase I : Inhibition activité catalytique de la Enzyme</p> <p>[Akendengue <i>et al.</i>, 1999; de Carvalho et Ferreira, 2001; Kayser <i>et al.</i>, 2003]</p>	
<p>Asteraceae : <i>Munnozia maronii</i></p>	<p>Sesquiterpènes : DehydrozalininC</p>	<p>In vitro : actif sur des promastigotes des différentes souches avec des CI₅₀ comprises entre 2,5 à 10µg/mL.</p> <p>Sur des promastigotes de <i>L. mexicana</i> et <i>amazonensis</i> le CI₉₀ = 25µg/mL</p> <p>In vivo : il se remarque une diminution de la sévérité des lésions causées par <i>L. amazonensis</i> sur des souris BALB/c. [Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001]</p>	
<p>Fabaceae : <i>Glycyrrhiza spp.</i></p>	<p>Chalcones : Licochalcone A</p>	<p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. donovani</i> et <i>major</i></p> <p>In vivo : inhibition des parasites de <i>L. major</i> dans des monocytes dérivés de macrophages du système sanguin périphérique humain à 1,4 µM</p> <p>Oralement et par voie péritonéale : à des doses orales 5-150 mg/kg/jour et intrapéritonéal à 20 mg/kg/jour e (6 jours) réduction des parasites (en foie et rate) de 65-85% et de 96% respectivement sur souris BALB/c infectées avec <i>L. major</i></p> <p>Voie péritonéale : à 2,5 mg/kg/jour prévient le développement des lésions sur des souris BALB/c infectées avec <i>L. major</i></p> <p>Peut induire la suppression du système immunitaire, inhibition des lymphocytes</p> <p>Altération de l'ultra-structure mitochondriale, affecte la chaîne respiratoire du parasite sans dommage sur les macrophages ou leur fonction phagocytaire</p> <p>[Akendengue <i>et al.</i>, 1999; Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001]</p>	

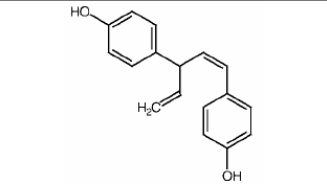
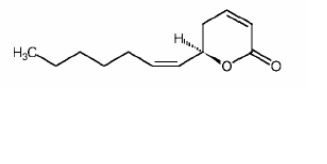
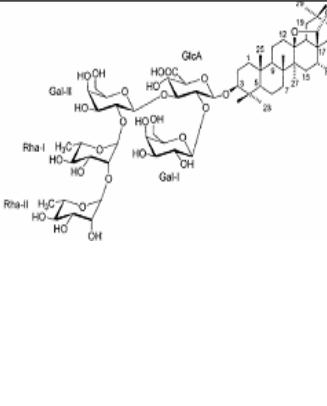
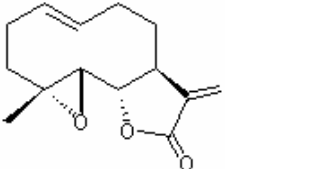
<p><i>Asparagus africanus</i></p>	<p>Lignane : Nyasol</p>	<p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. major</i> avec une CI_{50} 49 μM (semblable au pentostan avec un CI_{50} = 53 μM) Effets inhibiteur sur les lymphocytes humains à la même concentration [Akendengue <i>et al.</i>, 1999; de Carvalho et Ferreira, 2001]</p>	
<p>Annonaceae <i>Annona haemantantha</i></p>	<p>Argentilactone</p>	<p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. donovani</i>, <i>amazonensis</i> et <i>major</i> Administration subcutanée : sur des souris infectées par <i>L. amazonensis</i> à une dose de 25 mg/kg/jour pendant 14 jours, il réduit la taille de la lésion (résultats semblables au Glucantime®) [Akendengue <i>et al.</i>, 1999; Chan-Bacab et Peña-Rodríguez, 2001]</p>	
<p>Myrsinaceae <i>Maesa balansae</i> Mez.</p>	<p>Saponosides : Maesabalides (mélange des six saponosides de type oléane)</p>	<p>In vitro : actif sur des macrophages infectés par <i>L. infantum</i> avec un CI_{50} = 0,04 μg/mL (concentration cytotoxique sur macrophages de souris et sur de fibroblastes humains est respectivement de 1 μg/mL et >32 μg/mL) Administration subcutanée : une seule dose de 0,4 mg/kg le lendemain de l'infection (ou une dose 4 fois plus importante 14 jours après l'infection) réduit 95% des parasites (foie). (Pentostam ® à 250 mg/kg dose unique, à 1 et 14 jours après l'infection montre une inhibition de 95% des parasites) Une dose unique à 2,5 mg/kg ; 5 jours avant l'infection prévient l'infection du foie Oralement : à 200 mg/kg/jours pendant 5 jours n'est pas actif [Germonprez <i>et al.</i>, 2005; Maes <i>et al.</i>, 2004]</p>	
<p>Asteraceae <i>Tanacetum parthenium</i></p>	<p>Sesquiterpène lactone</p>	<p>In vitro : actif sur des promastigotes de <i>L. amazonensis</i> CI_{50} = 0,37 μg/mL Sur la phase intramacrophagique à une concentration de 0,81 μg/mL, l'indice de survie (SI) des parasites est de 50%. Ce composé ne montre pas d'effets toxiques sur des cultures des macrophages (J774G8). Il semblerait agir sur l'activité de l'enzyme cystéine protéase. Cela peut être lié aux changements dans la morphologie du parasite [Tiuman <i>et al.</i>, 2005]</p>	

Tableau 6.- Molécules d'origine naturel avec des activités antileishmanienne

Nous pouvons noter au vu de ce tableau que la flore bolivienne a permis la découverte de plusieurs molécules antileishmaniennes issues de nombreuses espèces végétales qui sont utilisées traditionnellement au sein des différentes communautés pour traiter les symptômes liés à la leishmaniose. [de Carvalho et Ferreira, 2001] Par exemple à partir de *Ampelocera edentula* (Ulmaceae), la 4-hydroxy-1-tétralone a été isolée et montre une activité très intéressante par rapport au médicament de référence (Glucantime®). De même, la gabunine, molécule très active *in vitro*, a été isolée de *Peschiera van heurkii* (Apocynaceae). La plumbagine, molécule issue de l'espèce *Pera benensis* (Euphorbiaceae), montre une activité semblable au Glucantime® (tableau 6) [de Carvalho et Ferreira, 2001; Fournet et Munoz, 2002].

12 alcaloïdes quinoliniques ont également été isolés de l'espèce *Galipea longiflora* (Rutaceae). C'est un arbre de la région amazonienne connu localement sous le nom d'**Evanta**. Cette espèce est utilisée dans la médecine traditionnelle au sein des communautés Tsimane, Tacana, Mosetene et Chimane. En effet, les écorces broyées fraîches et/ou sèches sont utilisées sous forme de cataplasme pour traiter les symptômes de la leishmaniose cutanée. En complément de ce traitement, des tisanes à base de cette plante sont également consommées pendant trois jours.

Pendant la période 1985-1991 un groupe de chercheurs français, travaillant à La Paz, au sein de l'IBBA (Instituto Boliviano de la Altura), a confirmé l'activité leishmanicide de l'espèce *Galipea longiflora*. 12 alcaloïdes ont été isolés et identifiés à partir des feuilles, des écorces et des racines de cette plante [Fournet *et al.*, 1993; Fournet *et al.*, 1989]. Parmi ces alcaloïdes, trois sont des structures nouvelles : la Chimanine D, la Chimanine B et la 2-*n*-propyl quinoline, qui se montrent très efficaces [Fournet *et al.*, 1994a; Fournet *et al.*, 1996; Fournet *et al.*, 1993; Munos *et al.*, 1994] et faiblement toxiques sur des modèles *in vivo*. Ces études ont abouti au dépôt d'un brevet Franco-Bolivien US 5541196.

L'IIFB (Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquimicas) au sein de la Faculté de Pharmacie à La Paz, a poursuivi les travaux sur cette espèce *G. longiflora*, et depuis environ 10 ans des tests d'évaluations antiparasitaires, cytotoxiques et pharmacologiques ont été mis en place (*in vitro* et *in vivo*). De plus, plusieurs collectes ont été effectuées pour s'assurer de la reproductibilité des tests biologiques et de la teneur en molécules actives des différents lots. [Giménez *et al.*, 2005].

L'IIFB a actuellement commencé les tests en phase I (traitement sur un nombre réduit de personnes saines) et II (traitement sur des patients sélectionnés en fonction des critères médicaux) des formulations pharmaceutiques topiques et systémiques à base des alcaloïdes totaux isolés des écorces de l'Evanta. Les résultats cliniques permettent d'établir les bases pour un développement durable de cette espèce en faisant profiter les communautés, l'université et les entreprises. De plus, cela permettra d'avoir une stratégie de soutien aux régions où la leishmanie est endémique. Ces résultats positifs sont un bon moyen de valoriser la médecine traditionnelle. Tous ces travaux sont réalisés avec le soutien du ministère de la santé en Bolivie, de la société de médecine traditionnelle et de l'agence internationale de coopération de Suède. [Giménez *et al.*, 2005].

III. Résultats et discussions

1.- Bioprospection sur le dispositif de Tunquini

L'approche qui est proposée dans ce travail de thèse consiste à valoriser et à protéger la biodiversité existante au sein des parcs nationaux protégés en Bolivie.

En octobre 2001, la Direction Générale de la Biodiversité (DGB) du Ministère bolivien du Développement Durable et le SERNAP (Service National des Aires Protégées) nous ont donné l'autorisation d'effectuer des recherches dans le Parc National de Cotapata PN-ANMI (Parque Nacional y Área Natural de Manejo Integrado) en respectant la loi sur l'accès aux ressources génétiques (figure 33).

Ce travail respecte la loi nationale de protection de la biodiversité bolivienne N° 1333 de 1992 et la Convention sur la Biodiversité (Rio 1992). Cette loi « Ley de la Republica N° 1580 » a été ratifiée le 25 juillet 1994. Les régulations concernant les ressources génétiques sont basées sur la Décision 391 de l'Accord de Cartagena : Régime Commun sur l'Accès aux Ressources Génétiques de la Communauté Andine des Nations, formalisé par le Décret Suprême 24676 de Juin 1997 [Gaceta *et al.*, 1997].

La première partie de ce travail est centrée sur le suivi phénologique mensuel assuré entre 2002 et 2005 dans des parcelles représentatives de la flore locale.

L'autre partie de l'étude porte sur la valorisation pharmacologique de la biodiversité végétale du parc (recherche d'antiparasitaires contre le paludisme et la leishmaniose).

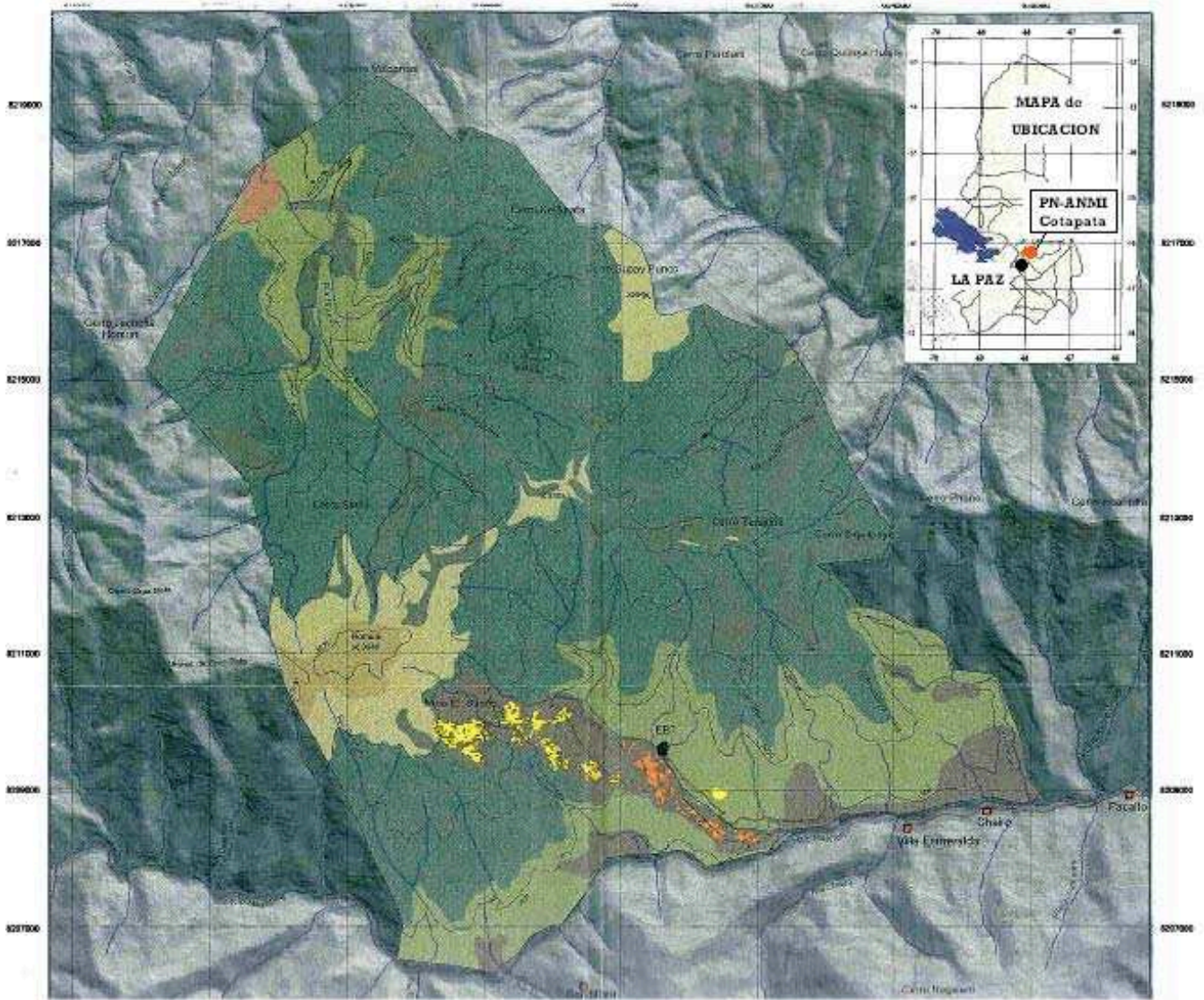
Mon travail a porté plus particulièrement sur la deuxième partie de cette étude cependant je présenterai également les résultats de la première partie dans un souci de cohérence du travail effectué en collaboration.

1.1.- Résultats et discussion sur le suivi phénologique

Le tableau 47 (annexes) montre la répartition des familles, des espèces et des individus en fonction des altitudes. Au total, 498 arbres ont été marqués dans les six parcelles. 442 individus ont été identifiés à l'espèce (89%), 49 individus au genre (10%). Le nombre d'espèces différentes identifiées est de 106 incluses dans 31 familles.

L'analyse du nombre d'individus par parcelle montre une représentation particulière de certaines familles et espèces. Les Rubiaceae, les Melastomataceae et les Euphorbiaceae sont les familles toujours présentes dans cinq des six parcelles.

- Ainsi à 1580 m d'altitude, deux espèces de la famille des Rubiacées sont fortement représentées, il s'agit de *Guettarda sabiceoides* et *Psychotria tinctoria*.
- A 1660 m, les familles les plus représentées sont les Melastomataceae avec *Meriania* aff. *axinaeoides*, *Miconia punctata* et les Rubiacées, notamment *Faramea candelabrum*, *Bathysa obovata*, *Elaeagia* cf. *marieae*.
- A 1720 m, les familles les plus représentées sont les Lauraceae, les Chloranthaceae avec l'espèce la plus fréquente qui est *Hedyosmum racemosum* et les Euphorbiaceae, surtout *Alchornea triplinervia*.
- A 2000 m, on trouve des Lauraceae du genre *Nectandra* (*N. cissiflora*, *N. turbacensis*), des Rubiaceae (*Psychotria conephoroides*) et des Melastomataceae (*Miconia affinis*).
- A 2365 m, les familles principales sont les Melastomataceae (*Tibouchina bicolor*), les Clethraceae (*Clethra revoluta*) et les Saxifragaceae (*Escallonia paniculata*).
- Finalement à 2730 m, les familles les plus fréquentes sont les fougères arborescentes notamment l'espèce *Cyathea delgadii*, la famille des Podocarpaceae avec l'espèce *Podocarpus rusbyi* et les Cunnoniaceae avec l'espèce *Weinmannia microphylla*.



MAPA DE VEGETACION DE LOS ALREDEDORES DE LA ESTACION BIOLÓGICA TUNQUINI, PARQUE NACIONAL Y AREA NATURAL DE MANEJO INTEGRADO - COTAPATA, La Paz, Bolivia

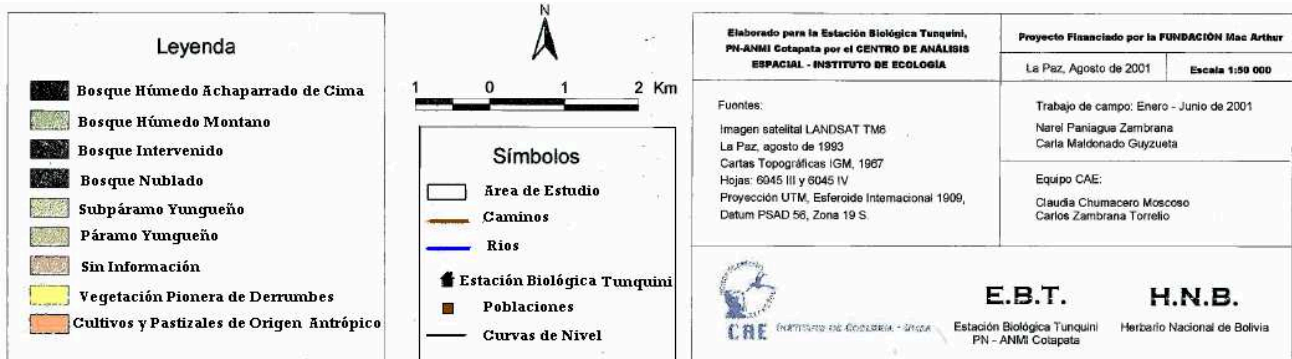


Figure 33. –Carte de la Station Ecologique de Tuniquini dans le PN-ANMI

Le dispositif de Tunquini mis en place en 2001 est toujours fonctionnel, la quantité d'arbres morts est de 6% en 5 ans (32 sur 499), taux normal de renouvellement dans les biotopes amazoniens. La chute des arbres est due à une lourde charge en épiphytes et lianes et à la forte pluviométrie saisonnière dans des habitats aux pentes particulièrement fortes.

Les 106 taxons identifiés à l'espèce provenant des parcelles ont fait l'objet d'une étude bibliographique exhaustive sur l'existence de travaux chimiques et/ou pharmacologiques antérieurs. La consultation des bases de données comme « Chemical Abstract » (<http://www.cas.org/>), « Medline » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>), et « Dictionary of Natural Products on CD-Rom » (<http://www.ramex.com/cr/cr-dict0.html>), montre l'absence de publications concernant 81 taxons sur les 106 et entre une à trois publications pour 19 taxons. Les taxons les plus étudiés sont *Alchornea pubescens* avec 4 publications, *Dendropanax arboreus*, *Tapirira guianensis* et *Virola sebifera*. Les principaux travaux en phytochimie sur ces espèces sont résumés ci-dessous :

Alchornea pubescens (Euphorbiaceae)

Des études effectuées sur cette espèce végétale ont permis d'isoler et d'identifier des diterpènes de type jatrophane qui montrent une inhibition moyenne de la prolifération cellulaire sur des cultures *in vitro* de différentes souches de cellules et sur des cultures de *Staphylococcus aureus* [Valente *et al.*, 2004c]. De la même façon des diterpènes macrocycliques de type jatrophane ont été identifiés et ont fait sujet de plusieurs criblages sur des cultures des différentes lignes cellulaires [Valente *et al.*, 2004a; Valente *et al.*, 2003; Valente *et al.*, 2004b].

Dendropanax arboreus (Araliaceae) :

L'extrait brut de *Dendropanax arboreus* a été l'objet d'un fractionnement bioguidé car il a montré une activité cytotoxique intéressante. Le composé responsable de la plus grande partie de la cytotoxicité est le falcarinol (polyacétylène). D'autres composés connus ont été aussi isolés (dehydrofalcarinol, falcarindiol, et dehydrofalcarindiol) [Bernart *et al.*, 1996]. De même, l'extrait alcoolique des feuilles a aussi présenté des propriétés cytotoxiques sur des lignes cellulaires tumorales. Par contre, il n'est pas actif sur des cultures d'hépatocytes [Setzer *et al.*, 1995].

Tapirira guianensis (Anacardiaceae)

De cette espèce ont été isolés quatre flavonoïdes glycosidiques [Compagnone *et al.*, 1997] ainsi que plusieurs composés comme le β -Sitostérol, le 3 β -O- β -D-glucopyranosyl-sitostérol, le stigmasténone, et le stigmast-4-en-6 β -ol-3 [Correia *et al.*, 2003]. L'étude de l'extrait méthanolique des graines de *T. guianensis* a permis d'isoler et d'identifier deux molécules nouvelles le 2-[10(Z)-heptadécényl]-1,4-hydroquinone et (4R,6R)-dihydroxy-4-[10(Z)-heptadécényl]-2-cyclohexénone. Ces molécules montrent des propriétés cytotoxiques [David *et al.*, 1998].

Virola sebifera Aubl. (Myristicaceae)

Les lignanes aryltetralone isolés des graines *V. sebifera* ont été étudiés pour leurs propriétés antioxydantes [Rezende *et al.*, 2005]. L'isolement de différents lignanes a fait l'objet de plusieurs publications [Harrowven *et al.*, 1998; Lopes *et al.*, 1982, 1983, 1984a, b; Martinez *et al.*, 1999; Rezende et Kato, 2002]. On note aussi la présence d'alcaloïdes indoliques [Kawanishi *et al.*, 1985; McKenna *et al.*, 1984] et de di-arylpropanes dans le bois de cette espèce [Von Rotz *et al.*, 1990] ainsi que des acylrésorcinols [Kato *et al.*, 1985].

La mise en place de cette arbothèque permanente ou chimiothèque patrimoine vivante a des vertus pédagogiques vis-à-vis des scientifiques et des autorités administratives responsables. Les chercheurs sont assurés d'un accès permanent à la ressource avec des possibilités d'étude sur site et en laboratoire. L'administration a eu la possibilité de contrôler de manière permanente les ressources génétiques utilisées. L'autorisation d'accès a été ainsi renouvelée régulièrement depuis 6 ans.

1.2.- Résultats et discussion sur la valorisation pharmacologique

Mon travail se centre plus particulièrement sur la recherche, l'isolement et l'identification des molécules ayant des activités antileishmaniennes. Cette démarche a commencé avec les criblages effectués sur ce parasite au sein du laboratoire de l'IIFB (Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquimicas) de la Faculté de Pharmacie, Université Mayor de San Andrés de La Paz en Bolivie. Ce criblage a été étendu à d'autres cibles comme *P. falciparum* et *T. cruzi*. Les résultats que nous avons obtenus seront également présentés ici.

1.2.1.- Premier criblage biologique effectué sur la totalité des espèces végétales

Trois voyages de collecte, entre septembre 2001 et septembre 2003, ont été effectués dans le dispositif de Tunquini, au sein du Parc National de Cotapata PN-ANMI. Des échantillons botaniques ont été collectés systématiquement et déposés à l'herbier National de Bolivie (LPB).

249 échantillons de feuilles, d'écorces et de tiges ont été collectés, correspondant aux différentes espèces de plantes identifiées. Les échantillons récoltés après avoir été séchés et puis broyés ont été stockés à l'herbier. 2 g de chaque échantillon ont été extraits à l'éthanol. Les extraits secs obtenus ont été évalués sur des cultures *in vitro* de promastigotes de *Leishmania* (tableau 7), de *Plasmodium falciparum* (tableau 8) et des épimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, agent responsable de la maladie de Chagas (tableau 9). Ces premiers criblages biologiques ont été réalisés au sein du laboratoire de recherche IIFB.

a) Activité antileishmanienne

Ce premier criblage sur des cultures de promastigotes nous a permis d'identifier huit espèces végétales avec des activités antileishmaniennes intéressantes (CI_{50} comprises entre 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Famille	Genre et espèce	Organe	PH 8 CI ₅₀	M 2903 CI ₅₀	PP 75 CI ₅₀
Chloranthaceae	<i>H. angustifolium</i>	Ecorces	13	14	14
Guttiferae	<i>Clusia</i> sp.	Ecorces	11	11	16
Lauraceae	<i>Ocotea</i> aff. <i>minarum</i>	Feuilles	16	11	24
Flacourtiaceae	<i>Casearia</i> sp. (nov. ?)	Feuilles	9	6	11
Flacourtiaceae	<i>Casearia</i> sp. (nov. ?)	Ecorces	27	27	18
Urticaceae	<i>Pilea multiflora</i>	Feuilles	30	27	17
Capparaceae	<i>Cleome lechleri</i>	Ecorces	18	15	21
Piperaceae	<i>Peperomia larecajana</i>	Feuilles	15	18	9
Piperaceae	<i>Peperomia larecajana</i>	Tiges	27	27	27
Anacardiaceae	<i>Tapirira guianensis</i>	Feuilles	27	17	19

Tableau 7.- Activités sur les cultures de promastigotes de *Leishmania* des espèces les plus prometteuses du dispositif de Tunquini

CI₅₀ en (µg.mL⁻¹)

PH 8 : *L. amazonensis* IFLA/BR/67/PH8 Brésil

M 2903 : *L. brasiliensis brasiliensis* MHOM/BR/75/M2903 Brésil

PP 75 : *L. donovani chagasi* MHOM/74/PP75 Brésil

Afin d'isoler et d'identifier de nouvelles molécules actives contre la leishmaniose nous avons sélectionné les plantes les plus prometteuses selon les critères suivantes :

- Le sujet doit être original par rapport aux travaux de recherche existants. Pour cela nous avons réalisé une bibliographie détaillée dans l'optique de choisir une espèce végétale peu travaillée.
- L'espèce végétale sélectionnée doit montrer une certaine abondance dans la zone de récolte. Ceci a garanti l'approvisionnement en matière première tout le long du processus de recherche.
- Le travail doit être poursuivi avec des individus (arbres ou arbustes) marqués. Ce marquage garanti la récolte ultérieure du même individu identifié comme potentiellement actif au moment de l'approvisionnement initial.

Les critères que nous avons mentionnés ci-dessus nous ont permis de sélectionner de façon préliminaire trois espèces parmi les huit plantes actives. Nous allons développer ci-dessous les critères retenus pour l'exclusion ou la sélection des espèces.

Casearia sp.

Casearia sp semble être une espèce nouvelle et endémique de la région de Tunquini. Mais, elle est peu abondante (un individu). Pour cette raison liée à la conservation botanique de la ressource, nous l'avons exclue de la liste préliminaire. La recherche bibliographique réalisée sur d'autres espèces du même genre démontre la présence de plusieurs familles de molécules (les cucurbitacines, les flavaglines, des anthraquinones, des acides gras, des alcaloïdes, des lignanes, des sesquiterpénoïdes et diterpénoïdes). Certaines de ces molécules notamment des diterpènes de type clérodane montrent des activités cytotoxiques, antipaludiques et faiblement antileishmaniennes [Balunas *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2003; Jullian *et al.*, 2005; Morita *et al.*, 1991].

Clusia sp.

Les échantillons appartenant à ce genre n'ont pas pu être identifiés au niveau de l'espèce. Pour cette raison nous l'avons éliminé des plantes à travailler. Les recherches bibliographiques réalisées sur des espèces de *Clusia* montrent la présence de benzophénone et xanthonnes isoprénylées ayant des activités antimicrobiennes, antifongiques, anticarcinogéniques et anti-HIV [Cuesta-Rubio *et al.*, 2005; Hostettmann et Wolfender, 1997; Iinuma *et al.*, 1996]. De plus, des anthranoïdes et des xanthonnes ont été identifiées comme ayant des activités antiprotozoaires [Azebaze *et al.*, 2007; Mbwambo *et al.*, 2004].

Ocotea aff. minarum

Des études préalables sur cette espèce ont démontré la présence d'alcaloïdes de type aporphiniques et indoliques grandement étudiées pour leurs activités antiparasitaires [Garcez *et al.*, 2005; Vecchiatti *et al.*, 1979]. C'est pour cela que cette espèce n'a pas retenu notre intérêt. Toutefois des études sur une autre espèce ont reporté récemment l'isolation d'un lignane (yangambine) isolé de *Ocotea duckei* qui se révèle être actif sur le développement postembryonnaire d'un diptère [Cabral *et al.*, 2007] et possède une activité sur la leishmaniose supérieure au glucantime. [Monte Neto *et al.*, 2007].

Peperomia larecajana

Cette espèce n'as pas fait l'objet d'études. Mais cette espèce est peu fréquente, le nombre d'individus est faible dans le dispositif. Nous avons donc exclu cette plante de l'étude finale. Des recherches effectuées sur d'autres espèces comme *P. japonica* ont démontré la présence de lignanes [Chen *et al.*, 1989]. L'extrait aqueux de *P. pellucida* montre des activités analgésique et anti-inflammatoire intéressantes [de Fatima Arrigoni-Blank *et al.*, 2004]. De plus l'extrait méthanolique de *P. pellucida* et la fraction butanol montrent des activités antibactériennes. [Khan et Omoloso, 2002].

Pilea cf. multiflora

L'espèce *P. multiflora* est une herbacée assez abondante et d'accès facile. De plus, aucune étude n'a été effectuée sur cette espèce. Des études sur d'autres espèces du même genre montrent que l'extrait organique des racines a une activité inhibitrice sur la réplication de l'ADN du virus de l'Hépatite B [Lee *et al.*, 2005]. Une autre équipe a isolé et identifié des triterpènes ayant des activités cytotoxiques à partir de *P. mongolica* [Kwon *et al.*, 1997].

Cleome lechleri

Cleome lechleri est un arbuste facile d'accès et assez abondant, ce qui peut faciliter l'approvisionnement. De plus, cette espèce n'a pas été étudiée. Les recherches bibliographiques sur d'autres espèces nous indiquent que l'extrait éthanolique des feuilles de *C. rutidosperma* montre une activité diurétique et laxative chez les rats albinos [Bose *et al.*, 2005]. De même, l'extrait hexanique de *C. viscosa* est actif sur des nématodes et sur des insectes. A partir de cet extrait, des terpènes ont été isolés, certains montrant des activités antibactériennes [Burke *et al.*, 1980; Williams *et al.*, 2003]. De plus, d'autres études sur *C. viscosa* ont démontré l'activité antidiarrhéique et antipyrétique de l'extrait méthanolique [Devi *et al.*, 2003; Parimala Devi *et al.*, 2002]. Dans d'autres espèces de *Cleome* des flavonoïdes glycosidiques ont été aussi isolés et identifiés [Bigdeli *et al.*, 2004].

Hedyosmum angustifolium

L'espèce *H. angustifolium* est un arbre, assez abondant et facile d'accès, qui a été peu étudié. En effet une seule étude a été effectuée caractérisant son contenu en huiles essentielles [Lorenzo *et al.*, 2003]. D'autres espèces de *Hedyosmum* ont été étudiées, notamment afin d'identifier les composants des huiles essentielles [Mundina *et al.*, 2000]. Une équipe a démontré la présence de flavonoïdes glycosylés isolés à partir des feuilles d'*H.*

bonplandianum [Cardenas *et al.*, 1993]. La présence de lactones sesquiterpéniques a été également mise en évidence [Bercion *et al.*, 2005; Trentin *et al.*, 1999].

En tenant compte de tous les critères mentionnés, nous avons choisi de façon préliminaire trois espèces végétales : *Hedyosmum angustifolium*, *Cleome lechleri* et *Pilea cf. multiflora*. Les activités de ces trois plantes sélectionnées ont été évaluées sur des cultures d'amastigotes axéniques à la plateforme de biologie de l'UMR – 152 à Toulouse.

b) Activité antiplasmodiale

Famille	Genre et espèce	Organe	% d'inhibition à 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Lauraceae	<i>Nectandra reticulata</i>	Feuilles	74
Euphorbiaceae	<i>Acalypha stachyura</i>	Ecorces	93
Melastomataceae	<i>Graffenrieda boliviensis</i>	Tiges	95
Alzateaceae	<i>Alzatea verticillata</i>	Feuilles	91
Euphorbiaceae	<i>Alchornea triplinervia</i>	Feuilles	80
Rubiaceae	<i>Cinchona pubescens</i>	Ecorces	94
Guttiferae	<i>Clusia</i> sp.	Feuilles	96
Euphorbiaceae	<i>Mabea</i> sp. nov.	Feuilles	94
Melastomataceae	<i>Meriania</i> aff. <i>axinioides</i>	Ecorces	89
Cunoniaceae	<i>Weinmannia</i> cf. <i>dryadifolia</i>	Feuilles	93
Euphorbiaceae	<i>Alchornea pearcei</i>	Feuilles	92
Myricaceae	<i>Morella pubescens</i>	Ecorces	95
Berberidaceae	<i>Berberis lutea</i>	Tiges	85
Compositae	<i>Munnozia oxyphylla</i>	Feuilles	90
Piperaceae	<i>Peperomia larecajana</i>	Feuilles	95
Piperaceae	<i>Peperomia larecajana</i>	Tiges	96
Chloranthaceae	<i>H. angustifolium</i>	Ecorces	96

Tableau 8.- Activités des espèces végétales les plus prometteuses de Tunquini sur les cultures de *P. falciparum* (F32 chloroquine sensible)

Les résultats des études sur l'activité antiplasmodiale sont répertoriés dans le tableau 8. Ces tests ont été effectués à l'IIFB en utilisant une méthode de comptage visuelle des parasites. Ces activités furent évaluées à nouveau à la plateforme de biologie de l'UMR – 152 en utilisant une autre souche et la méthode de l'incorporation de l'hypoxanthine tritiée, selon la méthode de Desjardins *et al.* [Desjardins *et al.*, 1979] modifiée par Valentin *et al.* [Valentin *et al.*, 1997].

c) Activité sur les épimastigotes de *T. cruzi*

Famille	Genre et espèce	Organe	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Guttiferae	<i>Clusia</i> sp.	Ecorces	< 20
Guttiferae	<i>Clusia</i> sp.	Feuilles	< 20
Solanaceae	<i>Saracha punctata</i>	Feuilles	< 20
Piperaceae	<i>Peperomia larecajana</i>	Tiges	< 20
Begoniaceae	<i>Begonia</i> cf. <i>altoperuviana</i>	Feuilles	< 20
Rubiaceae	<i>Cinchona calisaya</i>	Feuilles	< 20
Lauraceae	<i>Ocotea</i> aff. <i>jelskii</i>	Ecorces	< 20
Sabiaceae	<i>Meliosma</i> sp.	Feuilles	< 20
Theaceae	<i>Gordonia fructicosa</i>	Ecorces	< 20
Chloranthaceae	<i>H. angustifolium</i>	Ecorces	Inactive

Tableau 9. -Activités *in vitro* sur les cultures d'épimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Les résultats des études sur l'activité sur les épimastigotes sont répertoriés dans le tableau 9. Malheureusement nous n'avons pas pu approfondir les résultats de huit espèces actives contre les épimastigotes de *T. cruzi* car l'UMR 152 ne développe à Toulouse d'étude spécifique sur les trypanocides.

1.2.2.- Vérifications des activités biologiques

Nous avons ensuite effectué une seconde évaluation des plantes actives sur *L. amazonensis* et *P. falciparum*. Ces tests ont été réalisés au sein de notre laboratoire (UMR 152) à Toulouse en utilisant la méthode colorimétrique du MTT pour les amastigotes axéniques de *L. amazonensis* et pour les promastigotes de *L. braziliensis* (tableau 10) ainsi

que la méthode d'incorporation de l'hypoxanthine tritiée pour les cultures de *P. falciparum* FcB1 (souche résistante à la chloroquine) (tableau 11).

a) Activités antileishmaniennes

Les trois plantes précédemment actives sur les promastigotes de *Leishmania* ont été testées à nouveau sur des cultures d'amastigotes axéniques et montrent les résultats suivants (tableau 10).

Famille	Genre et espèce	Organe	Amastigotes CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Promastigotes CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Chloranthaceae	<i>H. angustifolium</i>	Ecorces	27	16
Chloranthaceae	<i>H. angustifolium</i>	Feuilles	30	20
Urticaceae	<i>Pilea multiflora</i>	Feuilles	Inactive	Inactive
Urticaceae	<i>Pilea multiflora</i>	Tiges	Inactive	Inactive
Capparaceae	<i>Cleome lechleri</i>	Ecorces	Inactive	Inactive
Capparaceae	<i>Cleome lechleri</i>	Feuilles	Inactive	Inactive

Tableau 10.- Activités *in vitro* de plantes sélectionnées sur les cultures d'amastigotes axéniques de *L. amazonensis* et sur les cultures des promastigotes de *L. braziliensis*

Nous avons pu vérifier que les extraits alcooliques d'*H. angustifolium* sont actifs sur la croissance *in vitro* de formes amastigotes axéniques de *L. amazonensis* et sur celle de la forme promastigotes de *L. braziliensis*. Cette plante semble donc prometteuse pour son activité antileishmanienne, c'est pourquoi nous l'avons choisie comme sujet d'étude. Les autres deux plantes ne sont actives sur aucune des deux cibles.

b) Activité antiplasmodiale

Les 17 extraits éthanoliques montrant une activité antiplasmodiale en Bolivie ont été testés à nouveau sur *P. falciparum* et les résultats sont résumés sur le tableau 11, seules sont présentés les CI₅₀ ≤ 10 µg.mL⁻¹.

Famille	Genre et espèce	Organe	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
Euphorbiaceae	<i>Alchornea triplinervia</i>	Feuilles	8,0
Rubiaceae	<i>Cinchona pubescens</i>	Ecorces	9,4
Melastomataceae	<i>Meriania aff.axinioides</i>	Ecorces	9,5
Cunoniaceae	<i>Weinmannia cf. dryadifolia</i>	Feuilles	10,0
Euphorbiaceae	<i>Alchornea pearcei</i>	Feuilles	4,3
Berberidaceae	<i>Berberis lutea</i>	Tiges	4,2
Chloranthaceae	<i>H. angustifolium</i>	Ecorces	Inactive

Tableau 11.- Activités *in vitro* sur les cultures de *P. falciparum* (FcB1 chloroquine résistante)

Ces deux criblages effectués sur *P. falciparum* nous ont permis d'identifier six espèces actives, parmi lesquelles *Cinchona pubescens*, qui est déjà connue pour contenir la quinine (médicament utilisé contre la malaria).

L'espèce *Berberis lutea* n'as pas fait l'objet d'études par contre le genre *Berberis* est connu pour contenir la berbérine, un alcaloïde isoquinoléique dont l'activité antipaludique est connue [Fournet et Munoz, 2002]. De plus, cet alcaloïde inhibe le développement d'autres parasites tels *G. lamblia*, *Entamoeba histolytica* et *T. vaginalis* [Birdsall et Kelly, 1997].

L'étude de *Alchornea triplinervia* a permis d'isoler et d'identifier des triterpenoïdes vraisemblablement responsables de l'activité cytotoxique de cette espèce [Braca *et al.*, 2002; Monks *et al.*, 2002]. L'espèce *Alchornea pearcei* n'a pas fait l'objet d'études. On remarque aussi qu'il n'existe que peu d'études sur le genre *Alchornea*, toutefois *Alchornea cordifolia* a montré des activités antiplasmodiales dues à la présence de polyphénols par exemple l'acide ellagique [Banzouzi *et al.*, 2002] ainsi qu'antibactériennes, antiinflammatoires et cytotoxiques [Lamikanra *et al.*, 1990; Mavar-Manga *et al.*, 2006; Osadebe et Okoye, 2003].

Les espèces *Weinmannia dryadifolia* et *Meriania axinioides* qui montrent des CI₅₀ assez intéressantes, n'ont fait l'objet d'aucune étude.

2.- Etude phytochimique bioguidée de *Hedyosmum angustifolium* (Ruiz & Pavón) Solms-Laubach

Les différentes étapes de purification ont été guidées par les résultats des activités antileishmaniennes. Chaque fraction a été ainsi évaluée sur les cultures *in vitro* d'amastigotes axéniques de *L. amazonensis*. Ces tests ont été effectués à différentes concentrations et toujours en triplicate.

2.1.- Processus d'extraction bioguidée

Nous avons réalisé plusieurs extractions successives sur 10 g d'écorces broyées (schéma 3). Les trois extraits obtenus ont été criblés sur des cultures d'amastigotes axéniques de *Leishmania amazonensis* (tableau 12). Il apparaît que l'extrait acétate d'éthyle (AcOEt) concentre l'activité avec un $CI_{50} < 25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

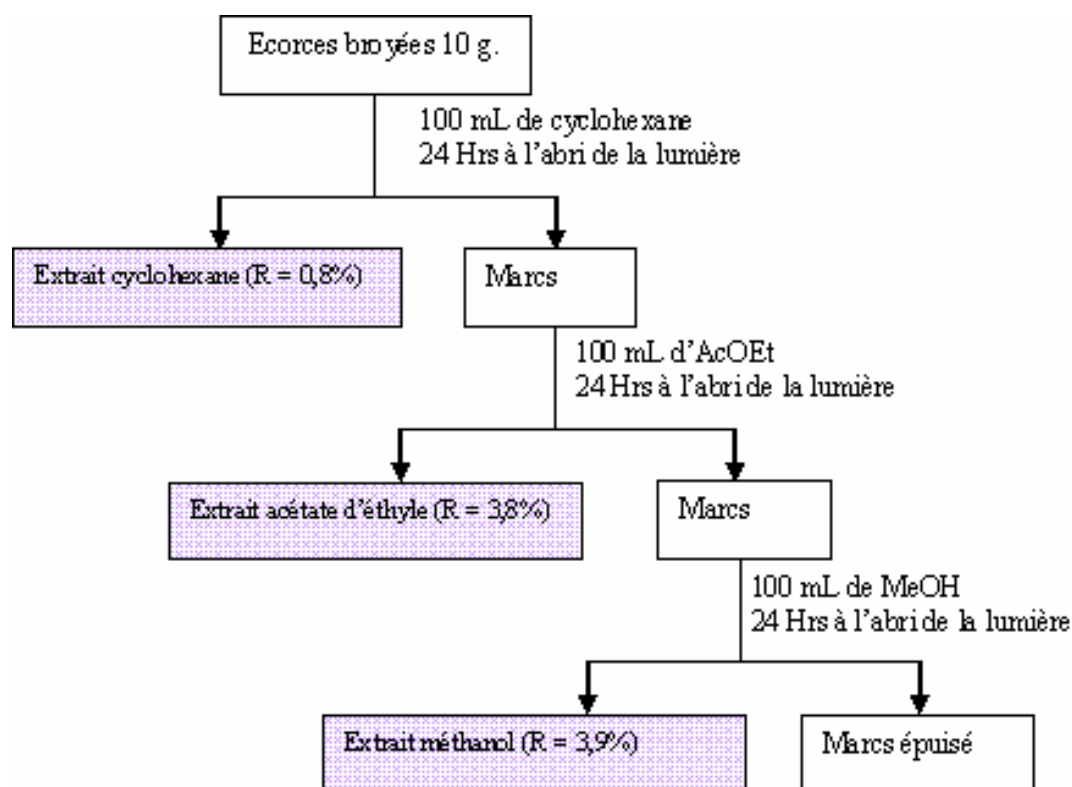


Schéma 3.- Extractions successives des écorces broyées de *H. angustifolium*

Extrait	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Masse (mg)	Rendement (%)
Cyclohexane	66	84	0,8
Acétate d'éthyle	< 25	377	3,8
Méthanol (MeOH)	96	390	3,9

Tableau 12.- Résumé des CI₅₀ obtenues pour les trois extraits bruts de *H. angustifolium*

La suite du travail se centre sur la recherche du meilleur processus d'extraction, en augmentant le rendement et en gardant l'activité. Nous avons essayé trois techniques sur 5 g d'écorces broyées : **a)** extraction à l'acétate d'éthyle à froid pendant 24 Hrs., **b)** extraction à chaud de l'acétate d'éthyle pendant 18 Hrs., **c)** extraction par percolation à l'acétate d'éthyle **d)** extraction au dichlorométhane (CH₂Cl₂) à froid pendant 24 Hrs, **e)** extraction au reflux du CH₂Cl₂ à 40°C pendant 18 Hrs et **f)** extraction par percolation au CH₂Cl₂. Les résultats sont décrits sur le tableau 13.

Type d'extrait	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Masse (mg)	Rendement (%)
Acétate d'éthyle à froid	18	250	5
Acétate d'éthyle à chaud	16	263	5,2
Acétate d'éthyle par percolation	17	270	5,4
Dichlorométhane à froid	17	219	4,3
Reflux au Dichlorométhane	18	274	5,4
Dichlorométhane par percolation	17	280	5,3

Tableau 13.- Activités calculés pour les six types d'extraits bruts

Nous observons que les résultats en activités et en rendements sont similaires pour tous les extraits. De plus, sur les Chromatographie en Couche Mince (CCM), les profils sont similaires. Donc, nous avons décidé de poursuivre le processus de purification bioguidée sur l'extrait acétate d'éthyle obtenu par percolation. En effet, cette technique permet l'obtention des extraits en peu de temps et en réalisant une économie de solvant.

2.2.- Purification bioguidée de l'extrait acétate d'éthyle

8 g d'extrait à l'acétate d'éthyle ont été fractionnés puis testés sur l'inhibition de la multiplication des amastigotes axéniques en culture (schéma 4).

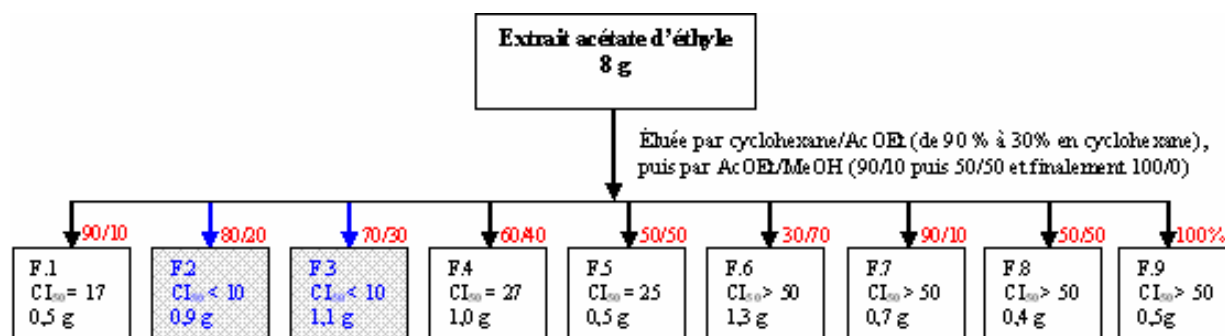


Schéma 4.- Fractionnement préliminaire de l'extrait acétate d'éthyle

Les CI₅₀ du schéma sont calculés en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$

Comme nous pouvons l'observer sur le schéma 4, les fractions **F.2** et **F.3** concentrent l'activité leishmanicide car leurs CI₅₀ sont inférieures à $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Nous développerons par souci de commodité du lecteur l'isolement des molécules M1 et M2. Ces deux molécules sont issues de la fraction F3. Ensuite, nous présenterons les résultats obtenus sur la fraction F2 (CI₅₀ < $10 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). En effet, toutes les autres molécules obtenues (M3, M4, M5, M6 et M7) ont été isolées à partir de cette dernière.

2.2.1.- Purifications et isolement des molécules M1 et M2

Deux composés purs **M1** et **M2** ont été obtenus à partir de la fraction F3. En effet, cette fraction a été soumise à plusieurs étapes de purification par chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) et par chromatographie liquide haute performance (CLHP) qui sont résumées dans le schéma 5.

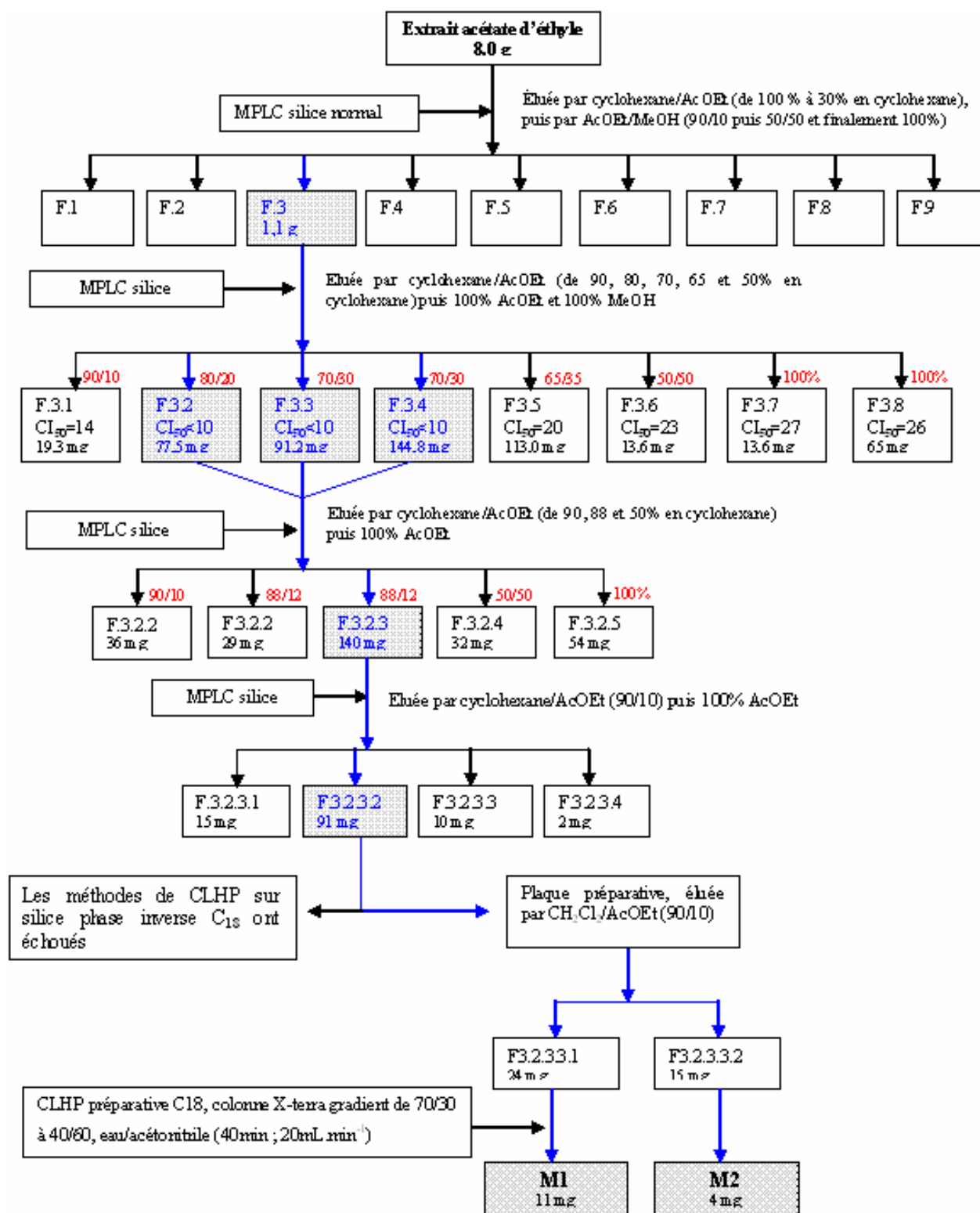
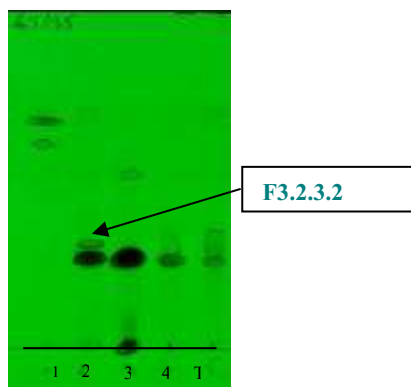


Schéma 5.- Schéma de purification des molécules M1 et M2

La fraction active F3 ($CI_{50} < 10 \mu g \cdot mL^{-1}$) est purifiée par MPLC silice normale. Huit fractions ont été obtenues dont les plus actives sont les fractions F.3.2, F.3.3 et F.3.4. Ces trois fractions actives montrent un profil semblable sur CCM. Elles ont été rassemblées puis ont

suivi deux étapes successives de purification par MPLC. Quatre fractions sont obtenues : F.3.2.3.1 à F.3.2.3.4. La fraction F.3.2.3.2 a été analysée par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^1H) et par spectrométrie de masse (SM). Ces résultats nous permettent d'affirmer que la sous fraction F.3.2.3.2 est un mélange des deux produits. Ce qui était difficile à déterminer sur CCM figure 34.



Détection aux UV à 254 nm, solvant de migration cyclohexane et AcOEt (65/35)

Figure 34.- CCM récapitulative après la troisième étape de purification

Nous avons essayé de séparer ces deux molécules par CLHP (silice phase inverse C_{18}) cette démarche a été vite abandonnée. On peut observer une séparation des deux produits sur colonne analytique. Par contre, il s'est avéré impossible d'obtenir une fraction pure en CLHP préparative car leurs temps de rétention étaient trop proches. Nous avons aussi fait quelques tentatives utilisant la chromatographie de partage centrifuge (CPC) sans succès.

Après l'essai de nombreux systèmes de solvants sur CCM, nous avons réussi à visualiser les deux molécules. En effet, le mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle (90/10) nous a permis d'observer deux tâches séparées sous U.V à 254 et 366 nm. Nous pouvons observer sur la figure 35 la séparation des deux tâches en changeant les systèmes d'élution.

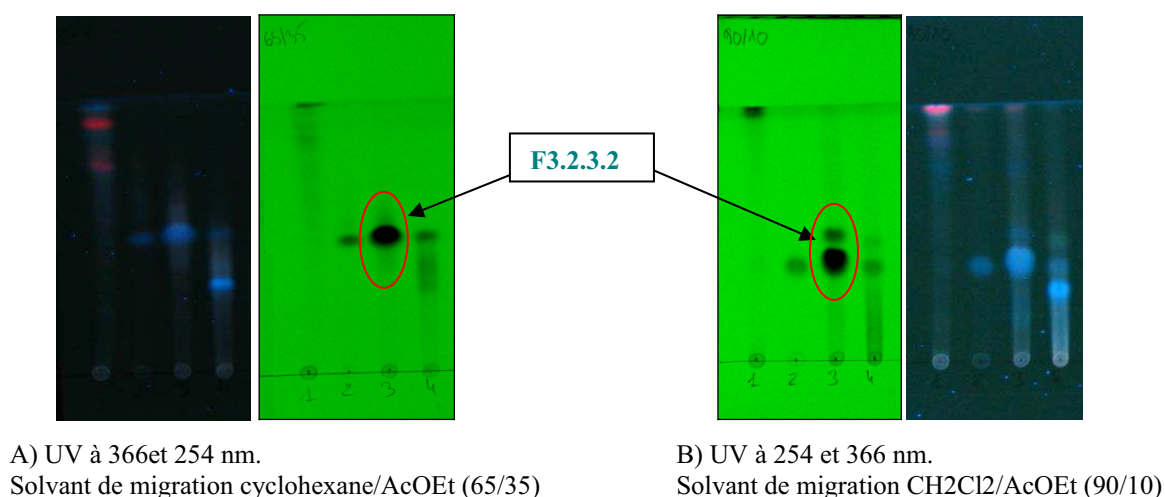


Figure 35.- Visualisation de deux composés sur la CCM (sous fraction F.3.2.3.2)

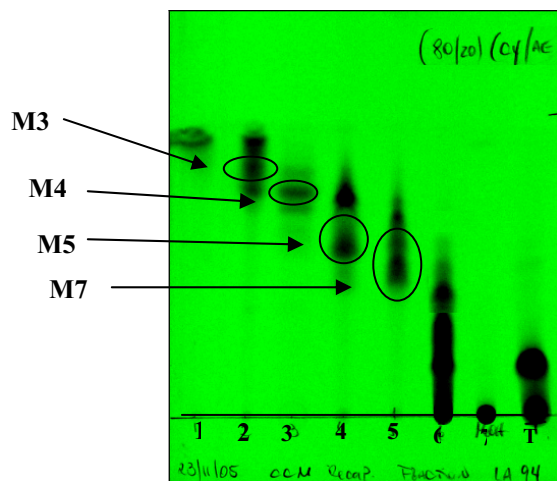
Les conditions trouvées par CCM (dichlorométhane/acétate d'éthyle ; 90/10) nous ont permis de séparer ces deux composés par chromatographie sur plaques préparatives de silice. Les deux fractions obtenues, pures à 90% ont été purifiées par CLHP préparative en phase inverse. La phase mobile consistait en un gradient d'eau/acétonitrile (70/30 à 40/60 en 40min, débit de 20mL.min⁻¹). Cette étape nous a permis d'obtenir environ 11 mg pour M1 et 4 mg pour M2.

Le rendement de purification après toutes ces étapes est de 0,004 % pour la molécule M1 et de 0,002 % pour la M2.

Fractionnement de la fraction F2

Nous allons présenter maintenant l'isolement des autres molécules M3, M4, M5, M6 et M7. L'ensemble de ces molécules a été obtenu à partir de la F2 (CI₅₀ < 10 µg.mL⁻¹). De plus, en vue d'approfondir l'étude des familles de molécules analogues aux précédentes nous avons décidé de purifier les composés qui s'avèrent détectables sous U.V. à 254 nm comme les molécules M1 et M2.

En effet, la fraction F2 est fractionnée sur MPLC silice normale. Sept fractions ont été obtenues dont la plus active est la fraction F.2.2 (163 mg, CI₅₀ = 8,0 µg.mL⁻¹). Sur la figure 36, nous observons les tâches correspondantes aux molécules isolées.



Détection à 254 nm.

Solvant de migration cyclohexane/AcOEt (80/20)

Figure 36.- CCM de suivi de fractionnement de la F2 après une étape de purification

2.2.2.- Purification et isolement de la molécule M3

La sous fraction (F.2.2) est purifiée par MPLC silice normale en utilisant comme éluant le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (Schéma 6). Huit sous fractions ont été obtenues et les fractions qui se visualisent le mieux à 254 nm sont F.2.2.3 et F.2.2.4. Ces deux fractions ayant un profil semblable sur la CCM, nous avons décidé de les rassembler puis de les purifier par MPLC silice normale.

La sous fraction F.2.2.3.4 a été purifiée par CLHP semi préparative en phase normale. La phase mobile consistait en un mélange isocratique dichlorométhane/cyclohexane (80/20 en 40min, débit de 5 mL.min⁻¹). Nous avons obtenu environ 2,5 mg de M3. Le rendement de purification après toutes ces étapes est de 0,001 %.

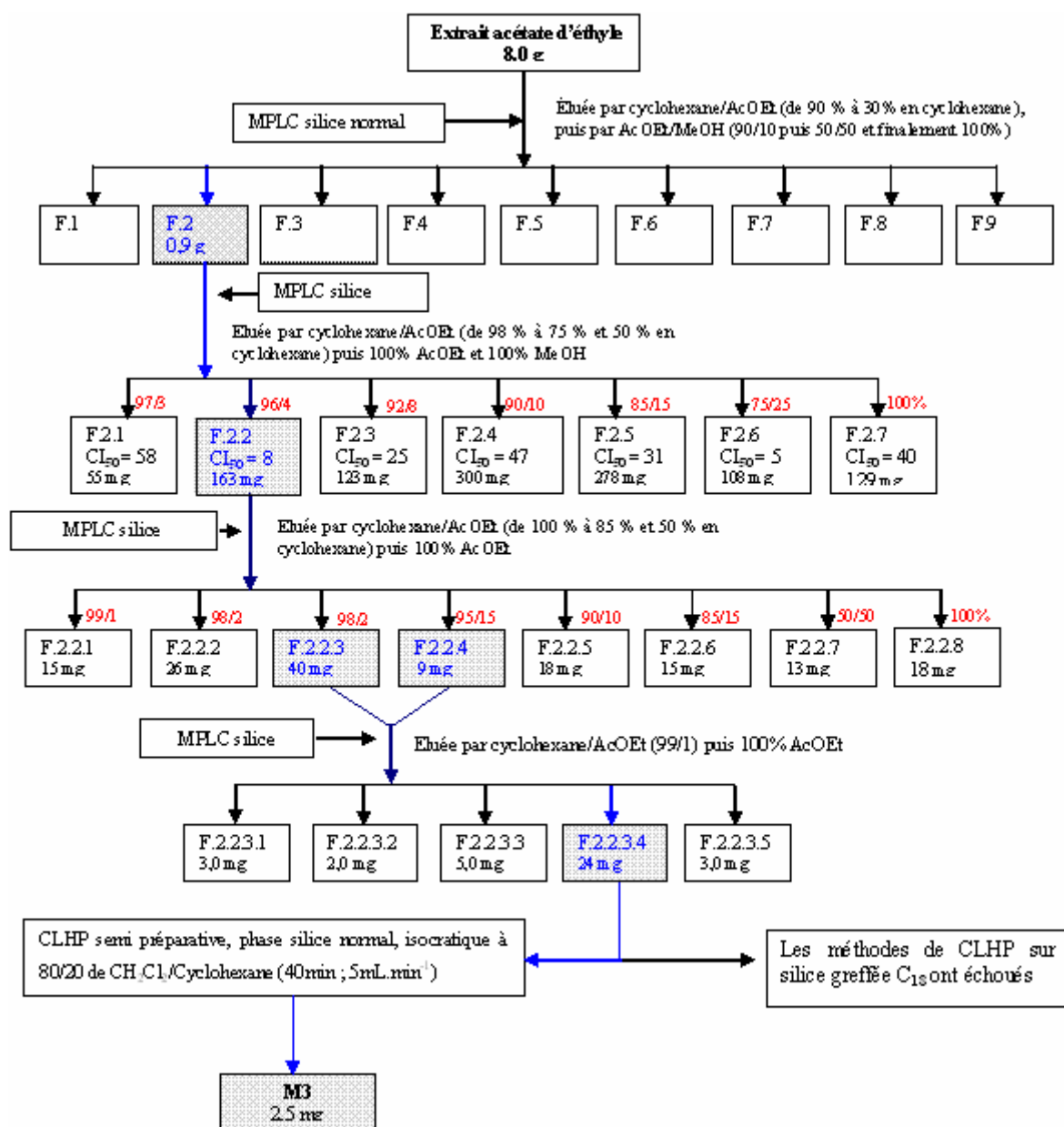


Schéma 6.- Schéma de purification de la molécule M3

2.2.3.- Purification et isolement de la molécule M4

Comme nous l'avons mentionné la fraction F2 a été éluée successivement par MPLC silice normale avec le mélange cyclohexane/acétate d'éthyle. Nous allons maintenant nous intéresser à la sous fraction F.2.3 (343 mg, CI₅₀ = 25,0 µg.mL⁻¹) (schéma 7).

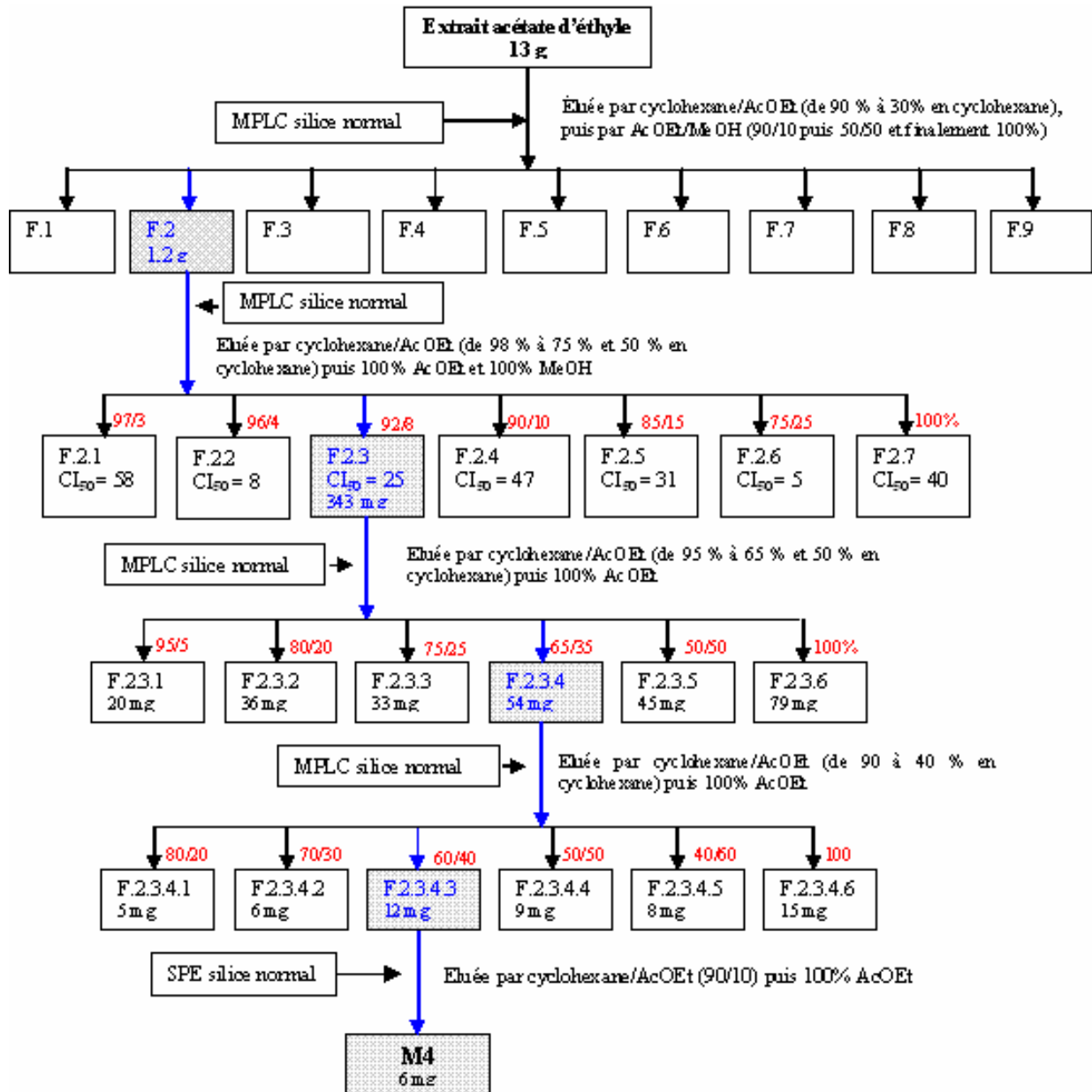


Schéma 7.- Schéma de purification de la molécule M4

Cette sous fraction F.2.3 a été purifiée par MPLC silice normale. Six fractions ont été obtenues et la sous fraction F.2.3.4 s'est avéré être la plus facile à suivre sous la lampe à 254 nm. Cette sous fraction a été fractionnée par MPLC. Enfin, la sous fraction F.2.3.4.3 est purifiée par SPE. A la fin de toutes ces étapes de purification, nous avons obtenu environ 6mg du produit avec un rendement de 0,002 %.

2.2.4.- Purification et isolement de la molécule M5

Nous allons maintenant nous intéresser à la sous fraction F.2.4 (270 mg, $CI_{50} = 47,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (schéma 8).

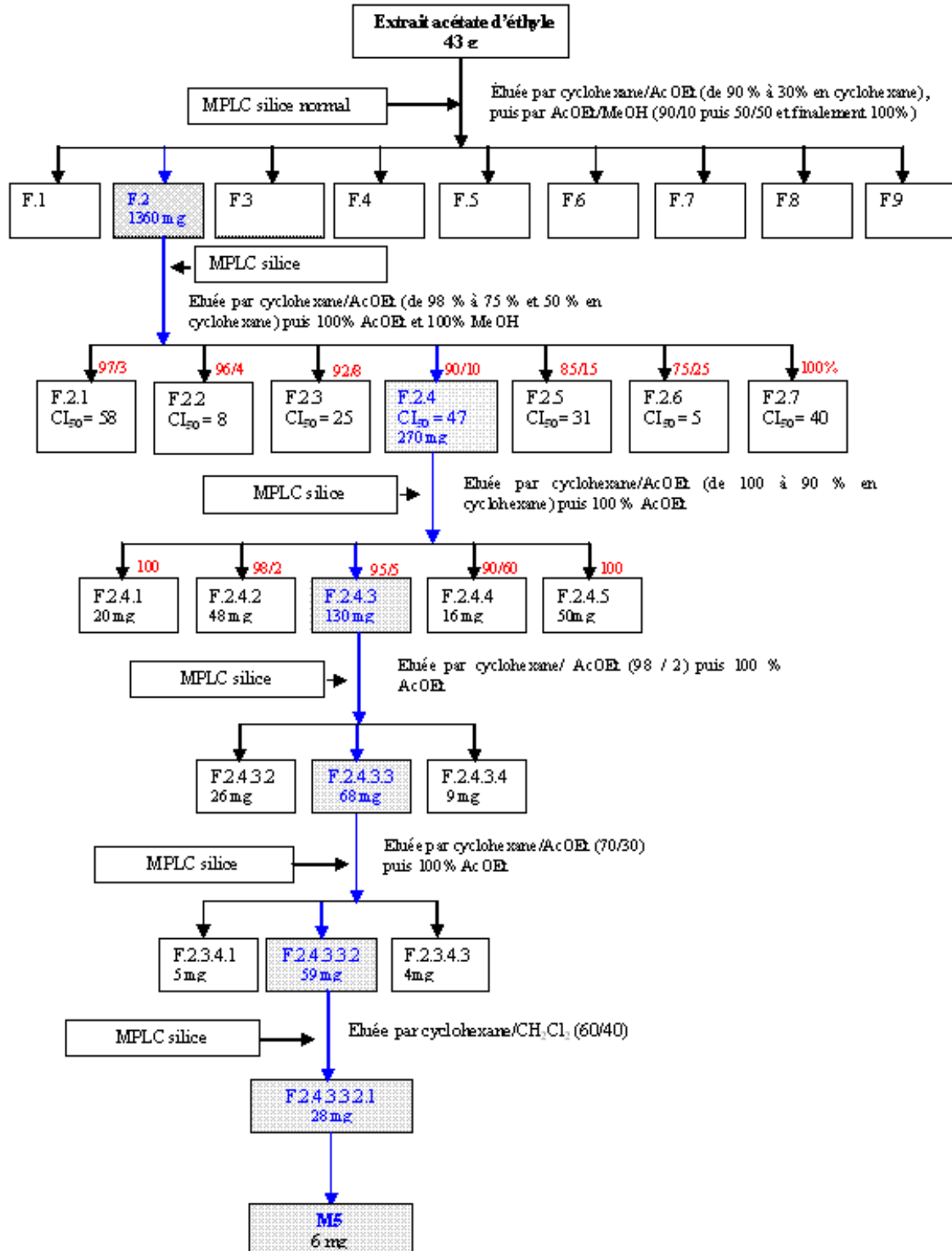


Schéma 8.- Schéma de purification de la molécule M5

La fraction F.2.4 a été éluée par MPLC sur silice normale utilisant comme éluant des mélanges de polarité croissante de cyclohexane et acétate d'éthyle. Cinq fractions sont obtenues dont la sous fractions F.2.4.3 a été soumise à deux fractionnements successifs par MPLC sur silice normale éluées avec des mélanges isocratique de cyclohexane et acétate d'éthyle, 98/2 et 70/30 respectivement. Trois fractions ont été obtenues dont la fraction F.2.4.3.3.2 a été éluée avec un mélange isocratique de cyclohexane et CH₂Cl₂ (60/40). Enfin la sous fraction F.2.4.3.3.2.1 est purifiée sur une SPE utilisant comme éluant le mélange isocratique cyclohexane et acétate d'éthyle (96/4). A la fin de cette démarche nous avons obtenu environ 6 mg. Le rendement de purification au terme de toutes ces étapes est de 0,001 %. Cette molécule a été analysée par RMN dans le benzène deutéré et par spectrométrie de masse.

2.2.5.- Purification et isolement de la molécule M6

Afin d'obtenir plus de masse du composé M5, nous avons réalisé une nouvelle extraction de l'écorce broyée en suivant le même schéma mais en essayant d'optimiser la purification afin d'utiliser moins de solvant. Une fraction semblable sur CCM à la fraction **F2.4** (paragraphe précédent) a été éluée sur silice normale par des mélanges de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (100, 99, 98, 95 et 90 % en cyclohexane, puis par 100 % en acétate d'éthyle et 100 % méthanol). Ensuite, la fraction contenant la molécule d'intérêt a subi deux étapes de purification sur colonnes SPE. La première a été éluée avec un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle 98/2 et la deuxième par 100 % cyclohexane puis par un mélange de cyclohexane et d'acétate d'éthyle 96/4.

La molécule isolée a été analysée par RMN dans le chloroforme deutéré et spectrométrie de masse. De façon surprenante la molécule isolée n'est pas **M5**, mais un isomère de **M5** appelée **M6** avec un rendement de 0,001 %.

2.2.6.- Purification et isolement de la molécule M7

La fraction F2.5 (278 mg, CI₅₀ = 31,0 µg.mL⁻¹) a été fractionnée successivement par MPLC sur silice normale avec un mélange cyclohexane/dichlorométhane. Ensuite une des sous fractions obtenues (F.2.5.4) a été purifiée par MPLC sur silice normale en utilisant comme éluant un mélange de cyclohexane/dichlorométhane (de 70 % à 30 % en cyclohexane

puis par 100 % en dichlorométhane et par 100 % en acétate d'éthyle). Trois fractions ont été obtenues dont la fraction F.2.5.4.2 qui est purifiée sur une colonne SPE éluée avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (97/3). Nous avons obtenu environ 13 mg de M7 avec un rendement de 0,004 % (schéma 9).

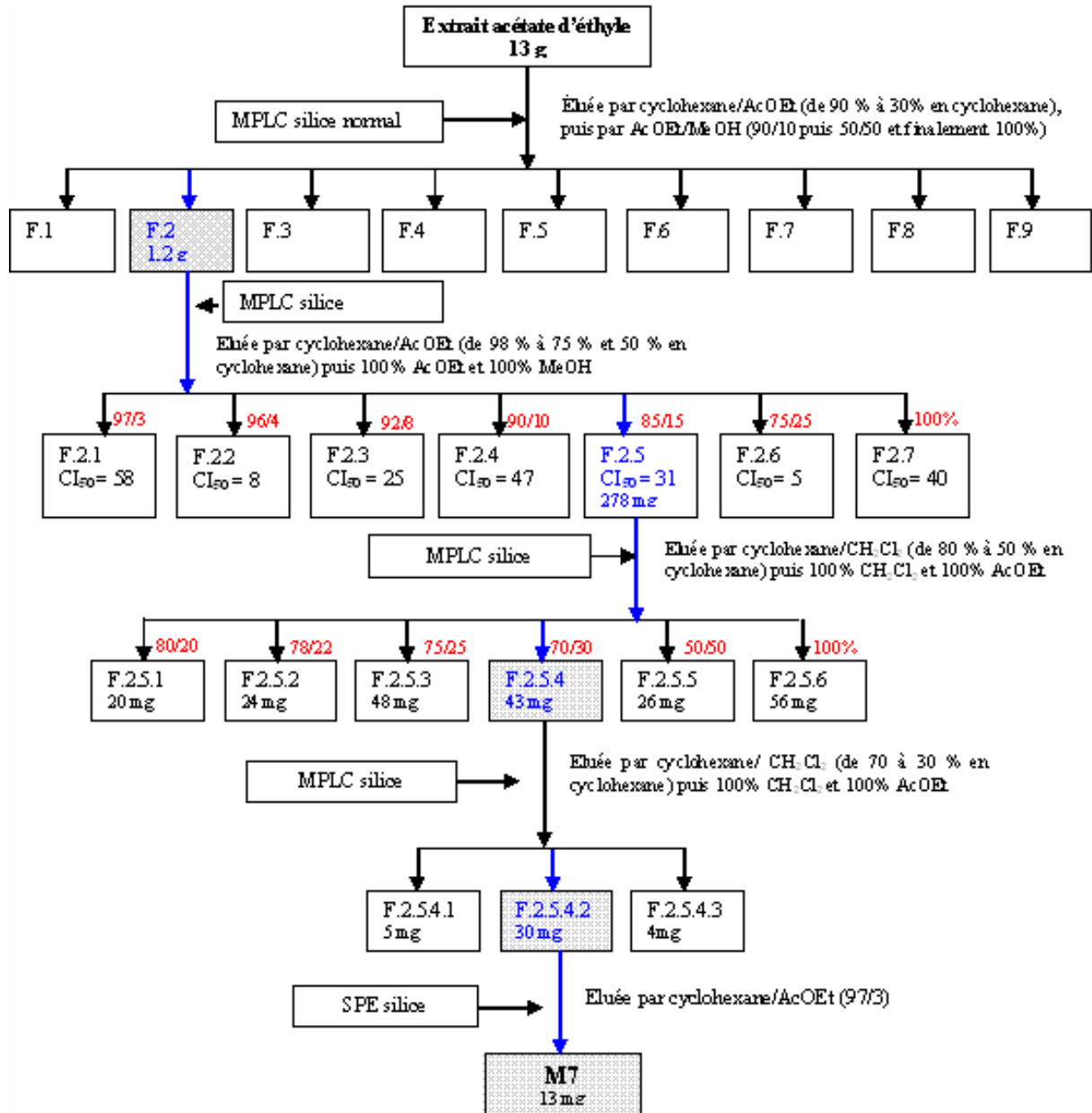


Schéma 9.- Schéma de purification de la molécule M7

Nous allons détailler dans le chapitre suivant l'élucidation des structures basée sur les données spectroscopiques que nous avons obtenues (IR, MS, RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC et NOESY).

3.- Détermination structurale des composés isolés de *Hedyosmum angustifolium*

Au total 7 composés ont été isolés à partir de l'extrait actif de l'acétate d'éthyle dont 2 proviennent de la fraction **F3** (**M1** et **M2**) et cinq de la fraction **F2** (**M3**, **M4**, **M5**, **M6** et **M7**).

L'élucidation des structures est basée sur l'interprétation des spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN), de la spectrométrie de masse (SM), des spectres d'infra-rouge (IR).

3.1.- Détermination structurale du composé **M1** : Onosériolide

Le composé **M1** se présente sous la forme d'un solide amorphe jaune. Il se révèle sous l'effet de la vanilline sulfurique montrant une couleur orange foncée, ainsi que sous la lampe U.V. à 254 et 366 nm, de plus son pouvoir rotatoire est de $[\alpha]_D = +50^\circ$.

Spectroscopie UV et spectroscopie infra-rouge

Le spectre UV présente deux maxima d'absorption à 196 nm et 286 nm. Le spectre infrarouge présente des bandes à 3540 cm^{-1} , 3078 cm^{-1} et 1756 cm^{-1} , indiquant la présence de, respectivement : un groupement hydroxyle, un cyclopropane et une γ lactone β insaturée.

Données de spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse réalisé en electrospray (ESI) en mode positif, nous observons un ion quasi-moléculaire à $m/z = 245$ $[M+H]^+$ suggérant une masse atomique de 244 uma.

Données de Résonance Magnétique Nucléaire

Le spectre RMN du ^{13}C enregistré en J-modulé (^{13}C -JMOD-RMN) indique la présence de 15 atomes de carbones dont 6 carbones quaternaires, 4 groupements CH, 4 méthylènes (CH_2) et un méthyle (CH_3).

A ce stade l'ensemble des données obtenues par IR, RMN et par MS nous ont permis de déterminer la présence d'une fonction γ lactone β insaturée ainsi que d'une fonction alcool, et la présence d'un cyclopropane. Ces données permettent de proposer pour la molécule M1 une formule brute de $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$ et donc un degré d'insaturation de 8.

a) Résonance magnétique du proton et du carbone

Le tableau 14 suivant présente les données de ^{13}C -JMOD-RMN et ses corrélations avec le spectre ^1H -RMN obtenus à l'aide du spectre HSQC.

Atome	δ Carbone (ppm)	δ Proton (ppm) (multiplicité, intégration, constante de couplage en Hz)	Type C
1	26,4	1,25 (<i>ddd</i> ; 1H ; 3,5 ; 7,7 ; 7,7)	-CH-
2 a	16,9	0,65 (<i>ddd</i> ; 1H ; 5,5 ; 7,7 ; 9,1)	-CH ₂ -
B		0,81 (<i>ddd</i> ; 1H ; 3,5 ; 3,7 ; 5,5)	
3	22,4	1,79 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
4	149,9	C _q	C=C
5	61,8	2,66 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
6 b	21,2	1,94 (<i>ddt</i> ; 1H ; 1,5 ; 13,4 ; 17,1)	-CH ₂ -
a		2,51 (<i>dd</i> ; 1H ; 3,7 ; 17,1)	
7	148,8	C _q	C=C
8	149,6	C _q	=C-O
9	120,9	5,98 (<i>s</i> ; 1H)	C=CH
10	39,5	C _q	-Cq-
11	124,9	C _q	C=C
12	169,4	C _q	C=O
13 a	55,4	4,19 (<i>dd</i> ; 1H ; 1,1 ; 14,2)	-CH ₂ -O
b		4,23 (<i>dd</i> ; 1H ; 1,1 ; 14,2)	
14	21,6	0,56 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
15 a	106,4	4,68 (<i>d</i> ; 1H ; 1,9)	C=CH ₂
b		5,09 (<i>ddd</i> ; 1H ; 0,9 ; 1,9 ; 2,3)	

Tableau 14.- Attributions des carbones et des protons à l'aide du spectre HSQC

L'analyse du spectre ^1H -RMN indique la présence d'un singulet d'intensité 3H à $\delta_{\text{H}} = 0,56$ ppm (H-14) correspondant aux protons d'un groupe méthyle. Nous avons aussi identifié deux doublets dédoublés chacun intégrant pour 1H à $\delta_{\text{H}} = 4,19$ ppm (H-13a) et à $\delta_{\text{H}} = 4,23$

ppm (H-13b) vraisemblablement portés par un carbone en α d'un oxygène. Ces deux protons constituent donc un système AB qui de plus est observable grâce à l'effet de toit engendré par la grande proximité des deux signaux.

Nous pouvons observer également trois signaux de protons éthyléniques : un doublet dédoublé dédoublé intégrant pour 1H à $\delta_H = 5,09$ (H15b), un triplet intégrant pour 1H à $\delta_H = 4,68$ ppm (H-15a) ainsi qu'un singulet intégrant pour 1H à $\delta_H = 5,98$ ppm (H-9).

Deux signaux blindés sont également remarquables : deux doublets dédoublés dédoublés intégrant chacun respectivement pour 1H à $\delta_H = 0,81$ ppm (H-2b) et à $\delta_H = 0,65$ ppm (H-2a).

Sur le ^{13}C -JMOD-RMN nous avons identifié la présence d'un groupe méthyle à $\delta_C = 21,6$ ppm (C-14), ainsi qu'un groupe exo-méthylène à $\delta_C = 106,4$ ppm (C-15). Nous avons aussi attribué le groupe carbonyle à $\delta_C = 169,4$ ppm (C-12) ce qui confirme la présence d'une fonction lactone observée en IR. Enfin, nous avons identifié un carbone méthylénique à $\delta_C = 55,4$ ppm (C-13) qui vu son déplacement chimique est lié vraisemblablement au groupement hydroxyle détecté en IR. L'ensemble des ces données se trouvent sur la figure 37.

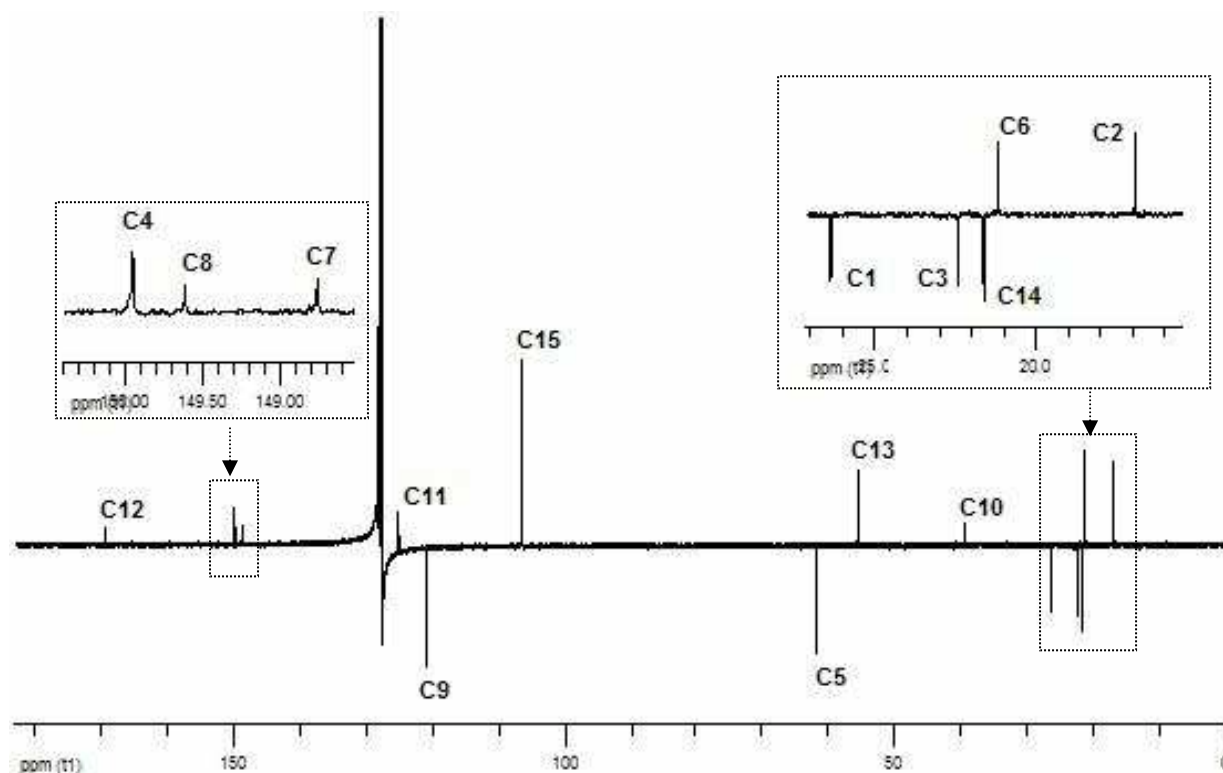


Figure 37.- Spectre RMN- ^{13}C du composé M1 dans le C_6D_6

b) Corrélations COSY

Sur le tableau 15 nous avons résumé les données obtenues sur le spectre COSY

Atome	δ Proton (ppm)	Corrélations et constantes de couplage en Hz
1	1,25 <i>ddd</i>	1-2a = 7,7 1-2b = 3,5 1-3 = 7,7
2 a	0,65 <i>ddd</i>	2a-2b = 5,5 2a-3 = 9,1 2a-1 = 7,7
2 b	0,81 <i>ddd</i>	2b-3=3,7 2b-1 = 3,5 2b-2a = 5,4
3	1,79 <i>m</i>	
5	2,66 <i>m</i>	
6 b	1,94 <i>ddt</i> ,	6b-6a = 17,1 6b-13 (a-b) = 1,5 6b-5 = 13,4
6 a	2,51 <i>dd</i>	6a-6b = 17,1 6a-5 = 3,7
9	5,98 <i>s</i>	
13 a	4,19 <i>dd</i>	13(a-b)-6b = 1,5 13b-13a = 14,2
13 b	4,23 <i>dd</i>	13 (a-b)-6b = 1,1 13b-13a = 14,2
14	0,56 <i>s</i>	
15 a	4,68 <i>d</i>	15a-15b=1,9
15 b	5,09 <i>ddd</i>	15b-15a = 1,9 15b-3 = 2,3 15b-5 = 0,9

Tableau 15.- Corrélations protons – protons obtenus à l'aide du spectre COSY

Sur le spectre COSY on observe que les protons H-2a, H2b, H-1 et H-3 corrélient entre eux et font partie du cyclopropane détecté en IR. Ces corrélations sont observables sur la figure 38.

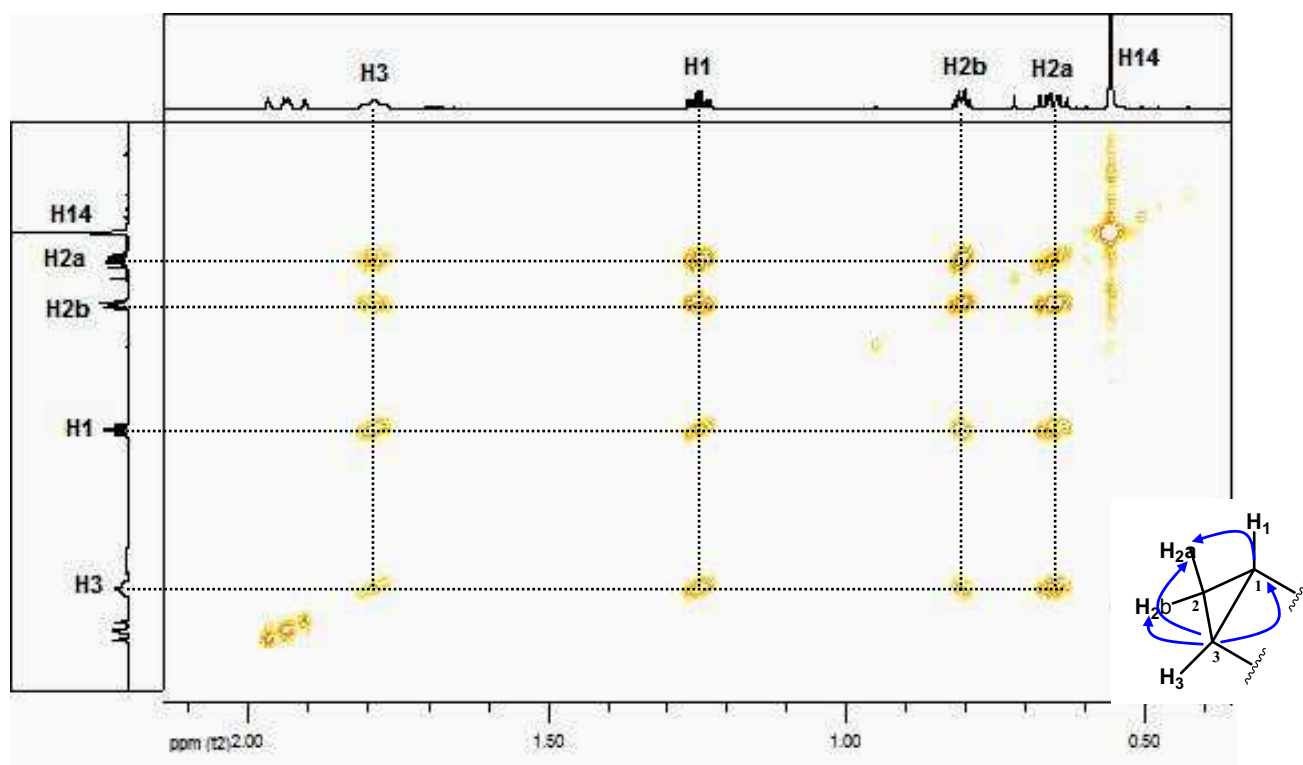


Figure 38.- Spectre COSY du composé M1 dans le C_6D_6 (description du cyclopropane)

De plus, le proton H-3 corrèle faiblement avec les protons H-15b et H-15a. Les constantes de couplages de ces corrélations n'ont pas pu être mesurées car le signal du H-3 sort sous la forme d'un multiplet. D'autre part, les protons de l'exométhylène H-15b et H-15a corrélient entre eux, et H-15b couple aussi avec H-5.

c) Corrélations HMBC

Les données sur les corrélations carbone-proton provenant du spectre HMBC sont détaillées sur le tableau 16.

Atome	δ Carbone (ppm)	HMBC (C→H)
1	26,4	H-2a ; H-2b ; H-9 ; H-14
2	16,9	H-1 (tf) ; H-14
3	22,4	H-1 (f) ; H-2a ; H-2b ; H-15a ; H-15b
4	149,9	H-1 ; H-2a ; H-2b ; H-15a ; H-15b
5	61,8	H-6a ; H-6b ; H-9 ; H-14 ; H-15a ; H-15b
6	21,2	H-14
7	148,8	H-6a ; H-6b ; H-9 ; H-13a ; H-13b
8	149,6	H-6a ; H-9
9	120,9	H-1 ; H-6a (f) ; H-14
10	39,5	H-1 ; H-2a ; H-2b ; H-5 ; H-6a ; H-9 ; H-14
11	124,9	H-6a ; H-6b ; H-13a ; H-13b
12	169,4	H-6a (tf) ; H-13a ; H-13b
13	55,4	
14	21,6	H-1 (f) ; H-9 (f)
15	106,4	

Tableau 16.- Corrélations carbones – protons obtenues sur le spectre HMBC

d) Attributions des signaux et construction de la molécule

L'attribution des signaux est réalisée à l'aide des données obtenues grâce aux spectres HMBC (tableau 16) et COSY (tableau 15). En effet, sur le spectre HMBC nous avons identifié les corrélations existantes entre les carbones C-1 ($\delta_C = 26,4$ ppm) et C-3 ($\delta_C = 22,4$ ppm) et les protons H-2a et H-2b. De plus, le C-3 et le C-2 ($\delta_C = 16,9$ ppm) corrélerent aussi avec le proton H-1. Ceci nous permet d'attribuer ces carbones à un groupe cyclopropane. Ces attributions sont confirmées par le spectre COSY (cycle A, figure 39a).

Ensuite H-3 montre en COSY une corrélation avec les deux protons H-15 de l'exométhylène. Le carbone C-4 ($\delta_C = 149,9$ ppm), quant à lui, corréle en HMBC avec les protons H-15a, H-15b, H-1, H-2a et H-2b. Ceux ci nous ont permis d'attribuer l'exométhylène C-15 et le C-4 (cycle B, figure 39b).

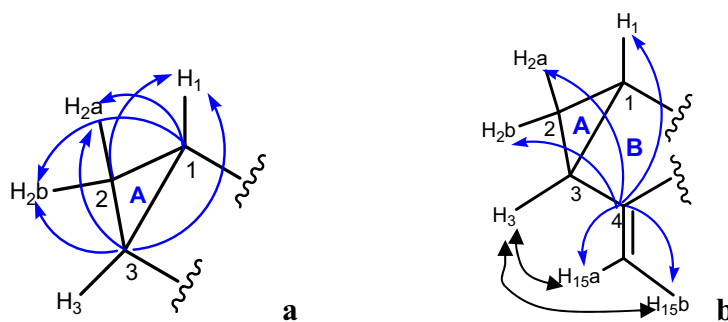


Figure 39.- Corrélations HMBC et COSY

\longleftrightarrow : corrélation COSY
 \curvearrowright : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

De même, le carbone C-5 ($\delta_{\text{C}} = 61,8$ ppm) corrèle en HMBC avec les deux protons H-15. De plus, sur le spectre COSY on observe les corrélations entre le proton H-5 et les deux protons H-6, permettant l'attribution des C-5 et C-6. Le spectre HMBC nous permet de constater que le carbone C-1 corrèle avec H-14 et H-9 et que le C-10 ($\delta_{\text{C}} = 39,5$ ppm) corrèle avec les protons H-9 et H-14. Ces données nous permettent d'attribuer les carbones C-9 et C-10. Ces attributions sont confirmées par les corrélations en HMBC du C-5 avec H-14 et H-9. Nous détaillons ces attributions sur la figure 40a (cycle C, figure 41a).

De plus les deux protons H-6, les protons H-13 ainsi que H-9 corrèlent avec le carbone à $\delta_{\text{C}} = 148,8$ ppm (hybridé sp^2) ce qui nous permet d'attribuer le C-7. Ensuite, sur le spectre HMBC on observe que le carbone à $\delta_{\text{C}} = 124,9$ ppm corrèle avec les protons H-13 et ces même deux protons corrèlent avec le carbonyle, permettant l'attribution de C-11 et C12 respectivement et enfin, le carbone à $\delta_{\text{C}} = 149,6$ ppm est donc attribué comme C-8 confirmé par la corrélation de ce même carbone en HMBC avec H-9 (cycle D, figure 40b).

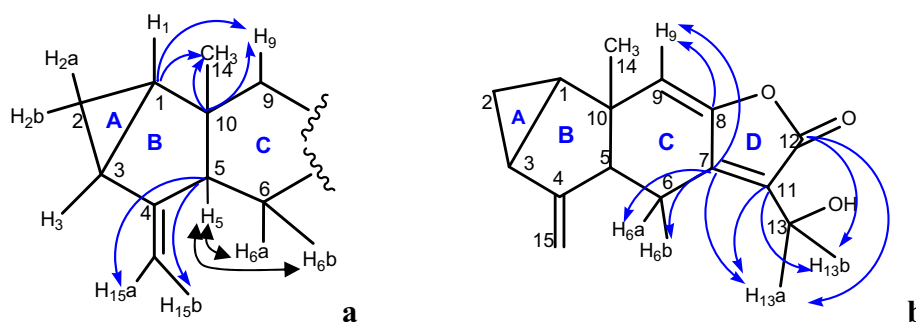


Figure 40.- Corrélations HMBC et COSY

\longleftrightarrow : corrélation COSY
 \curvearrowright : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

e) Corrélations NOESY

Les données de NOESY sont détaillées dans le tableau 17.

Atome	δ Proton (ppm)	NOESY (H→H)
1	1,25	H-2a ; H-3 ; H-9
2 a	0,65	H-1 ; H-2b ; H-3
2 b	0,81	H-2a ; H-14
3	1,79	H-1 ; H-2a ; H-5 ; H-15b
5	2,66	H-3 ; H-6a
6 b	1,94	H-6a; H-14 ; H-15a
6 a	2,51	H-5 ; H-6b ; H-15a
9	5,98	H-1 ; H-14
13 a	4,19	H-6a ; H-6b
13 b	4,23	H-6a ; H-6b
14	0,56	H-2b ; H-6b ; H-9
15 a	4,68	H-6a ; H-6b ; H-15b
15 b	5,09	H-3 ; H-15a

Tableau 17.- Corrélations obtenus sur le spectre NOESY

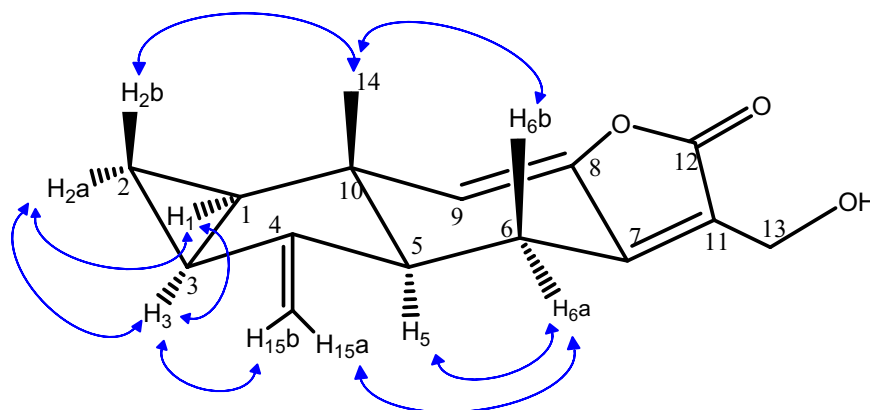


Figure 41.- Corrélations proton-proton : spectre NOESY

L'analyse du spectre NOESY (tableau 17 et figure 41) et des constantes de couplages (tableau 15) nous a permis d'établir la configuration relative de la molécule grâce aux corrélations entre les différents protons. En effet, la constante de couplage entre H5 et H6b (13 Hz) nous indique une conformation de type *trans diaxial*.

On observe clairement que les protons H-14 corrélient à la fois avec les protons H-2b et H-6b, ce qui nous permet de dire que cet ensemble de protons forment trois groupement pseudoaxiaux.

De même, le proton H-1 corrèle avec H-2a et H-3, et H-3 corrèle avec H-5 et avec H-2a. De son côté, H-6a corrèle avec H-5, ces cinq protons se trouvent donc en *anti* des groupes axiaux précédemment définis.

D'autre part, nous avons pu identifier la corrélation entre H-15b et H-3 ce qui veut dire que H-15b se trouve à proximité du proton H-3. Ceci est confirmé par la corrélation NOESY observée entre H-15a et les deux protons H-6. En ce qui concerne les protons H-13a et H-13b nous n'avons pas pu les discriminer ni sur le COSY ni sur le NOESY (car ces deux protons émettent un signal de même déplacement chimique).

L'analyse des spectres HSQC, HMBC, COSY et NOESY nous a permis d'identifier **M1**, comme étant une molécule déjà isolée et décrite sous le nom d'onosériolide. Elle a été isolée de deux espèces végétales : de *Hedyosmum brasiliense* (Chlorantaceae) [Trentin *et al.*, 1999] et d'*Onoseris albicans* (Asteraceae) [Bohlmann *et al.*, 1980]. Les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec les données publiées pour cette molécule (figure 42).

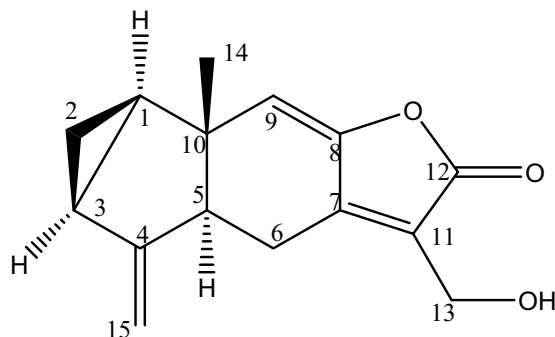


Figure 42.- Structure de M1 : Onosériolide

3.2.- Détermination structurale du composé M2 : Oxyonosériolide

Le composé **M2** se présente sous la forme d'un solide amorphe jaune. Il se révèle sous l'effet de la vanilline sulfurique montrant une couleur violette, ainsi que sous la lampe U.V. à 254 et 366 nm, de plus son pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = -92,5^\circ$.

Spectroscopie UV et spectroscopie infra-rouge

Le spectre UV présente un seul maximum d'absorption à 225 nm. Le spectre infrarouge présente des bandes à 3421 cm^{-1} , 3078 cm^{-1} , 1773 cm^{-1} et 1253 cm^{-1} indiquant la présence de, respectivement : un groupement hydroxyle, un cyclopropane, une γ lactone β insaturée et un époxyde.

Données de spectrométrie de masse

Le spectre de masse haute - résolution enregistré en ESI-Q-TOF-HRMS indique un ion quasi-moléculaire en mode positif m/z 261.1159 $[M+H]^+$ indiquant une formule brute de $C_{15}H_{16}O_4$ ($[M+H]^+$ calculé 261.1127 pour $C_{15}H_{17}O_4$). Ceci nous indique la présence d'un atome d'oxygène supplémentaire par rapport à la molécule décrite précédemment.

Données de résonance magnétique nucléaire

Le spectre RMN du ^{13}C enregistré en J-modulé (^{13}C -JMOD-RMN) indique la présence de 15 atomes de carbones dont 6 carbones quaternaires, 4 groupements CH, 4 méthylènes (CH_2) et un méthyle (CH_3).

A ce stade l'ensemble des données obtenues par IR, RMN et par MS nous ont permis de déterminer la présence d'une fonction γ lactone β insaturée ainsi que d'une fonction alcool, la présence d'un cyclopropane ainsi que d'une fonction époxyde. La molécule M2 a une formule brute de $C_{15}H_{16}O_4$ et donc un degré d'insaturation de 8.

a) Résonance magnétique du proton et du carbone

Le tableau 18 présente les données de ^{13}C -JMOD-RMN et ses corrélations avec le spectre ^1H -RMN obtenues à l'aide du spectre HSQC.

Atome	δ Carbone (ppm)	δ Proton (ppm) (multiplicité, intégration, constante de couplage Hz)	Type C
1	23,9	1,34 (<i>ddd</i> ; 1H; 3,6; 7,7; 7,7)	-CH-
2 a	16,6	0,59 (<i>ddd</i> ; 1H; 5,4; 7,7; 9,0)	-CH ₂ -
2 b		0,66 (<i>ddd</i> ; 1H; 3,6; 3,7; 5,4)	
3	23,0	1,81 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
4	150,0	C _q	C=C
5	50,7	3,41 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
6 b	21,3	1,96 (<i>ddt</i> ; 1H; 1,6; 13,3; 19,5)	-CH ₂ -
6 a		2,25 (<i>ddt</i> ; 1H; 1,4; 5,2; 19,5)	
7	154,0	C _q	C=C
8	88,0	C _q	-C _q -O
9	64,2	3,82 (<i>s</i> ; 1H)	-CH-O
10	40,7	C _q	-C _q -
11	131,2	C _q	C=C
12	168,7	C _q	C=O
13 a	55,7	4,05 (<i>d</i> ; 1H; 14,6)	-CH ₂ -O
13 b		4,11 (<i>d</i> ; 1H; 14,6)	
14	16,4	0,29 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
15 a	106,6	4,59 (<i>d</i> ; 1H; 2,8)	C=CH ₂
15 b		5,05 (<i>ddd</i> ; 1H; 0,6; 1,4; 2,8)	

Tableau 18.- Attributions des carbones et des protons à l'aide du spectre HSQC

Le spectre ^1H -RMN nous a permis d'identifier de la même manière que pour la molécule M1 le groupement méthyle H-14 ainsi que les deux protons H-13a et H-13b, qui apparaissent ici aussi sous la forme d'un système AB.

Par similarité avec le spectre de la molécule M1 nous avons pu déterminer les protons blindés H-2a et H-2b ainsi que les protons de l'exométhylène H-15a et H-15b.

Toutefois, le spectre proton de la molécule M2 montre une différence significative par rapport à celui de M1. En effet, on n'observe plus le proton à $\delta_{\text{H}} = 5,98$ ppm mais on observe l'apparition d'un proton plus blindé à $\delta_{\text{H}} = 3,82$ ppm, dont le déplacement chimique laisse supposer la présence d'un oxygène en position α (figure 43).

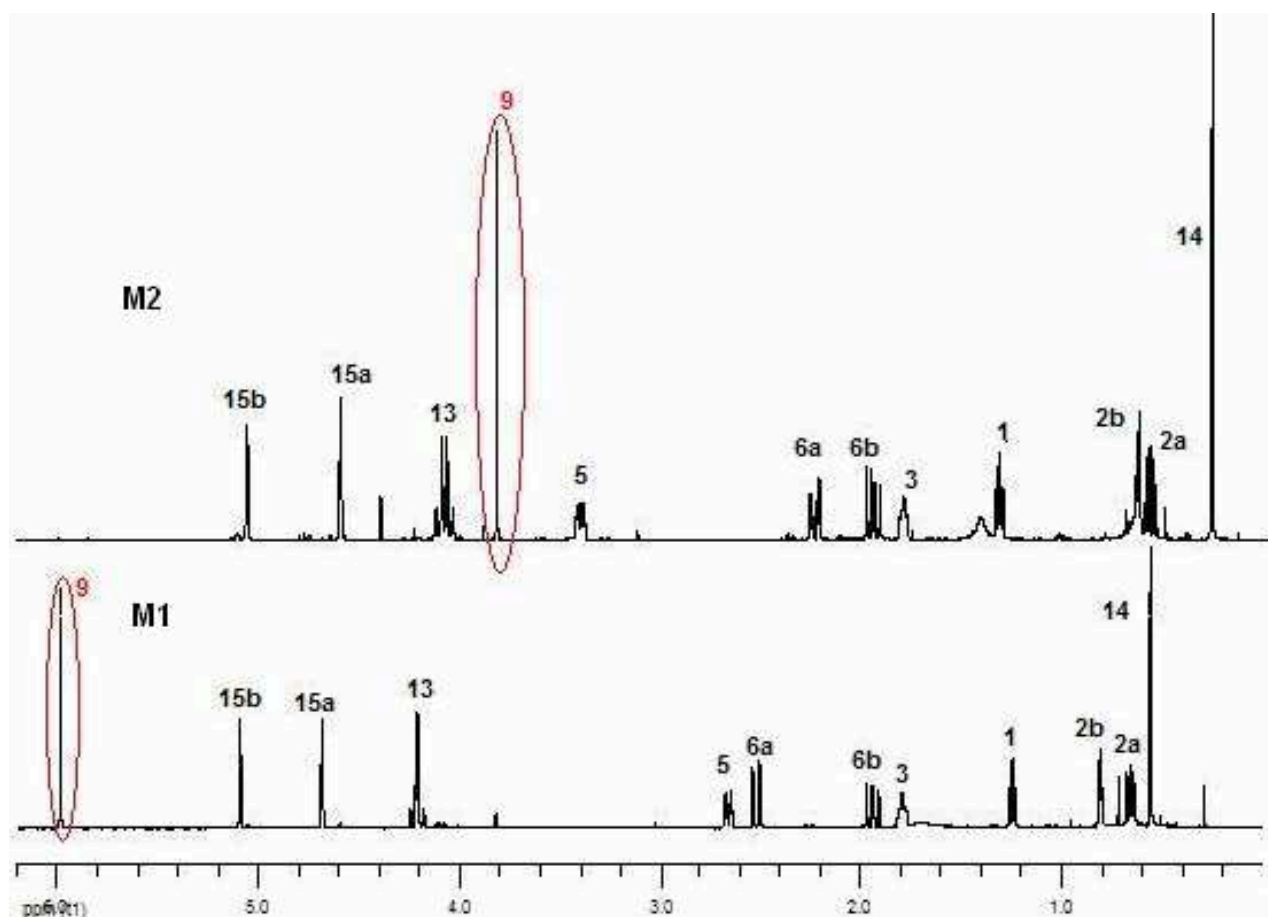


Figure 43.- Spectres RMN ^1H des composés M1 et M2 dans le C_6D_6

Sur le spectre ^{13}C -JMOD-RMN, nous avons pu identifier par analogie avec le spectre du composé précédent M1, le groupement méthyle C-14, l'exométhylène C-15, le groupe carbonyle C-12 qui confirme la présence de la fonction lactone observée en IR. Nous avons aussi confirmé la présence du cyclopropane due aux deux protons blindés ($\delta_{\text{H}} = 0,59$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 0,66$ ppm) portés par le carbone C-2 ainsi que le carbone lié vraisemblablement au groupement hydroxyle détecté en IR à $\delta_{\text{C}} = 55,4$ ppm (C-13).

Toutefois une différence notable par rapport à la molécule M1 apparaît ici aussi. En effet, les carbones C-8 et C-9 sont maintenant blindés ce qui nous permet d'émettre l'hypothèse que ces deux atomes ne sont plus liés entre eux par une double liaison. En tenant compte de leurs déplacements chimiques respectifs on peut supposer que ces deux carbones sont liés à un oxygène. Ces données sont observées sur la figure 44.

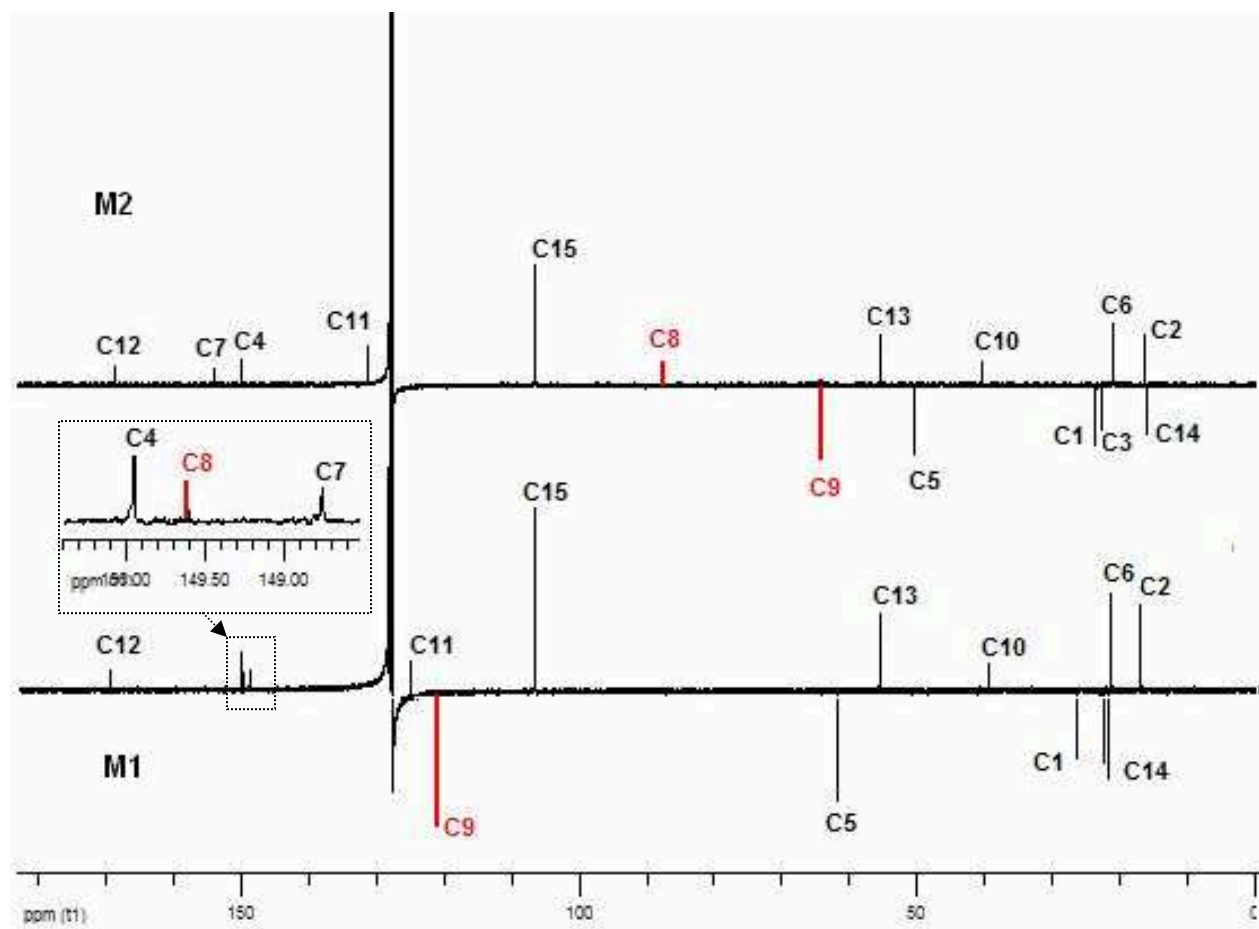


Figure 44.- Spectres RMN ^{-13}C des composés M1 et M2 dans le C_6D_6

b) Corrélations COSY

Sur le tableau 19 nous avons résumé les données obtenues grâce au spectre COSY.

Atome	δ Proton (ppm)	Corrélations et constantes de couplage en Hz
1	1,34 <i>ddd</i>	1-2a = 7,7 1-2b = 3,6 1-3 = 7,7
2 a	0,59 <i>ddd</i>	2a-2b = 5,4 2a-3 = 9,0 2a-1 = 7,7
2 b	0,66 <i>ddd</i>	2b-3 = 3,7 2b-1 = 3,6 2b-2a = 5,4
3	1,81 <i>m</i>	
5	3,41 <i>m</i>	
6 b	1,96 <i>ddt</i>	6b-6a = 19,5 6b-13 (a-b) = 1,6 6b-5 = 13,3
6 a	2,25 <i>ddt</i>	6a-6b = 19,5 6a-5 = 5,2 6a-13 (a-b) = 1,6
9	3,82 <i>s</i>	
13 a	4,05 <i>d</i>	13a-13b = 14,6
13 b	4,11 <i>d</i>	13b-13a = 14,6
14	0,29 <i>s</i>	
15 a	4,59 <i>d</i>	15a-15b = 2,8
15 b	5,05 <i>ddd</i>	15b-15a = 2,8 15b-5 = 1,4 15b-3 = 0,6

Tableau 19.- Corrélations protons-protons obtenues à l'aide du spectre COSY

Nous observons que le spectre COSY de la molécule M2 est tout à fait similaire à celui obtenu pour la molécule M1.

c) Corrélations HMBC

Les données sur les corrélations carbones protons provenant du spectre HMBC sont résumées sur le tableau 20.

Atome	δ Carbone (ppm)	HMBC (C \rightarrow H)
1	23,9	H-2a ; H-2b ; H-9 ; H-14
2	16,6	H-14
3	23,0	H-1 ; H-2a ; H-2b ; H-15a ; H-15b
4	150,0	H-1 (f) ; H-2a ; H-2b ; H-6b ; H-15a (f) ; H-15b (f)
5	50,7	H-6a ; H-6b ; H-9 ; H-14 ; H-15a ; H-15b
6	21,3	H-14
7	154,0	H-6a ; H-6b ; H-13a ; H-13b
8	88,0	H-6a ; H-6b ; H-9
9	64,2	H-1 (f) ; H-14
10	40,7	H-1 ; H-2a ; H-2b ; H-6a ; H-9 ; H-14
11	131,2	H-6a ; H-6b ; H-13a ; H-13b
12	168,7	H-6a (tf) ; H-6b ; (tf) ; H-13a ; H-13b
13	55,7	
14	16,4	H-1 (f)
15	106,6	

Tableau 20.- Corrélations carbones-protons obtenues sur le spectre HMBC

d) Attributions des signaux et construction de la molécule

L'attribution des signaux est réalisée à l'aide des données obtenues des spectres HMBC (tableau 20) et COSY (tableau 19). Le spectre HMBC nous a permis de retrouver les corrélations existantes au niveau du cyclopropane observé sur la molécule M1. Cela est d'ailleurs confirmé par le spectre COSY entre les protons H-1, H-2a, H-2b et H-3 (cycle A, figure 45a).

Nous retrouvons aussi les corrélations COSY entre H-3 et les deux protons H-15. De plus, sur le spectre HMBC nous identifions les corrélations entre C-4 et les protons H-15a, H-15b, H-1, H-2a et H-2b, ce qui nous permet l'attribution de C-4 et C-15 (cycle B, fig. 45b).

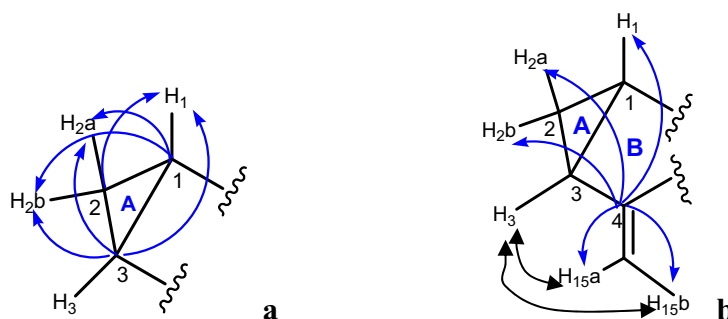


Figure 46.- Corrélations HMBC et COSY

\longleftrightarrow : corrélation COSY

\curvearrowright : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

De la même manière, nous avons pu retrouver les corrélations précédentes au niveau du cycle C. En effet, nous avons pu attribuer le C-5, C-6, C-9, C-10 et C-14 (cycle C, figure 46a).

De plus les deux protons H-6 et les protons H-13 corrélient avec le carbone à $\delta_C = 154,0$ ppm permettant d'attribuer le C-7. Ensuite, sur le spectre HMBC on retrouve les corrélations entre C-11 et les protons H-13 ainsi que avec les protons H-6. Ces quatre protons corrélient aussi avec le carbonyle, ce qui nous a permis d'attribuer C12. Finalement le carbone à $\delta_C = 88,0$ ppm est donc attribué comme C-8, confirmé par les corrélations surtout avec H-9 et les protons H-6. Les observations en IR, SM et RMN nous permettent de placer la fonction époxy sur les carbones C-8 et C-9 (cycle D, figure 46b).

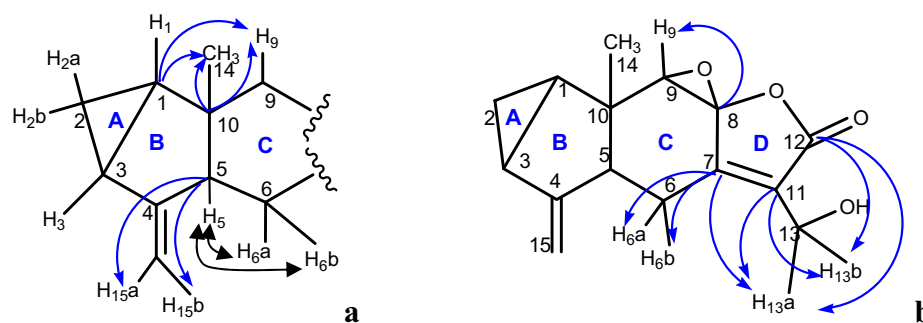


Figure 47.- Corrélations HMBC et COSY

↔ : corrélation COSY
 ↗ : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

e) Corrélations NOESY

Les données de NOESY sont résumées dans le tableau 21.

Atome	δ Proton (ppm)	NOESY (H→H)
1	1,34	H-2a ; H-3 ; H-5 ; H-9
2 a	0,59	H-1 ; H-2b ; H-3
2 b	0,66	H-2a ; H-14
3	1,81	H-1 ; H-2a ; H-5 ; H-15b
5	3,41	H-6a ; H-6b ; H-1 ; H-3
6 b	1,96	H-5 ; H-6a ; H-13a ; H-13b ; H-14 ; H-15a
6 a	2,25	H-5 ; H-6b ; H-13a ; H-13b ; H-15a
9	3,82	H-1 ; H-14
13 a	4,05	H-6a ; H-6b
13 b	4,11	H-6a ; H-6b
14	0,29	H-2b ; H-6b ; H-9
15 a	4,59	H-6a ; H-6b ; H-15b
15 b	5,05	H-3 ; H-15a

Tableau 21.- Corrélations obtenues sur le spectre NOESY

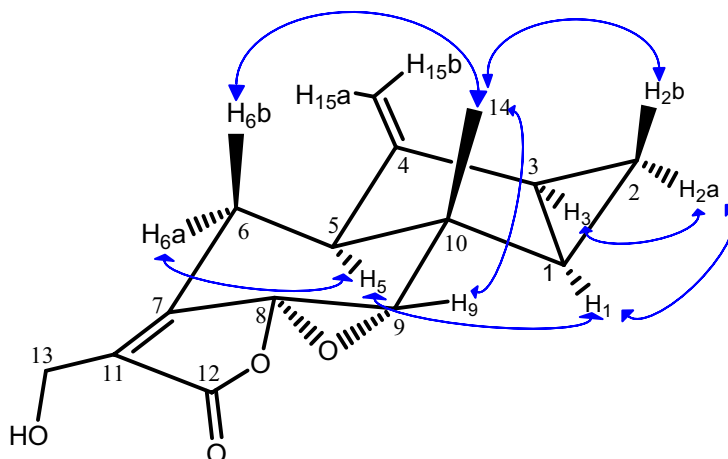


Figure 47.- Corrélations spectre NOESY

L'analyse du spectre NOESY (tableau 21 et figure 47) et des constantes de couplages (tableau 19) nous a permis d'établir la configuration relative de la molécule grâce aux corrélations entre les différents protons. Comme nous l'avons remarqué précédemment la constante de couplage entre H5 et H6b (13 Hz) nous indique une conformation de type *trans* *diaxial* pour ces deux protons.

On observe de la même manière que pour M1 les corrélations entre les protons H-14 avec les protons H-2b et H-6b, ce qui nous permet de dire que cet ensemble de protons forme trois groupements pseudoaxiaux.

Toutefois, en comparaison avec la molécule M1, la tâche de corrélation entre H-14 et H-9 est plus importante dans le cas de la molécule M2. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que H-9 est maintenant plus proche spatialement de H-14, ce qui implique que H-9 est équatorial par rapport au cycle C. Donc, l'époxyde est en position *anti* par rapport au méthyle 14.

L'ensemble de protons H-1, H-2a, H-3, H-5 et H-6a montrent les mêmes corrélations que dans la molécule M1, ce qui implique que ces cinq protons se trouvent donc en *anti* des groupes axiaux précédemment définis.

Enfin, les protons H-15 gardent les mêmes corrélations que précédemment, la disposition spatiale de la molécule M2 est donc inchangée par rapport à M1.

L'analyse des spectres HSQC, HMBC, COSY et NOESY nous ont permis d'identifier et d'élucider la structure de **M2** en nous basant sur les données de la molécule précédente (M1). Donc nous pouvons dire que **M2** est une nouvelle lactone sesquiterpénique de type lindénane et que la seule différence avec la molécule M1 est la présence de la fonction époxyde (figure 48).

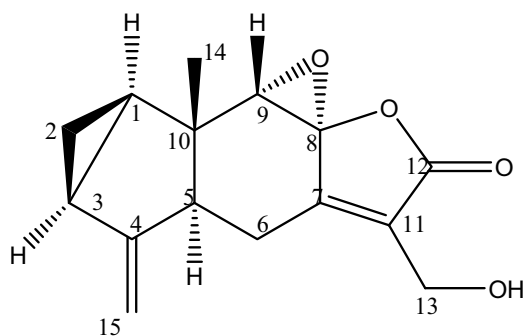


Figure 48.- Structure de M2, oxyonosériolide

3.3.- Détermination structurale du composé M3 : Chloranthalactone A

Le composé **M3** se présente sous la forme d'un solide amorphe jaune pâle. Il se révèle sous l'effet de la vanilline sulfurique montrant une couleur marron, ainsi que sous la lampe U.V. à 254 nm.

Spectroscopie infra-rouge

Le spectre infrarouge présente des bandes à 3078 cm^{-1} et 1767 cm^{-1} indiquant la présence de, respectivement : un cyclopropane et une γ lactone β insaturée.

Données de spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse réalisé en électrospray (ESI) en mode positif, nous observons un ion quasi-moléculaire à $m/z = 229$ $[M+H]^+$ suggérant une masse atomique de 228 uma (16 unités de masse en moins par rapport M1). On peut donc suspecter un atome d'oxygène en moins dans la formule brute de M3 par rapport au composé décrit M1 précédemment.

Données de Résonance Magnétique Nucléaire

Le spectre RMN du ^{13}C enregistré en J-modulé (^{13}C -JMOD-RMN) indique la présence de 15 atomes de carbones dont 6 carbones quaternaires, 4 groupements CH, 3 méthylènes (CH_2) et 2 méthyles (CH_3).

L'ensemble des données obtenues par IR, RMN et par MS nous ont permis de déterminer la présence d'une fonction γ lactone β insaturée ainsi que la présence d'un cyclopropane. Ces données permettent de proposer pour la molécule **M3** une formule brute de $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$ et donc un degré d'insaturation de 8.

a) Résonance magnétique du proton et du carbone

Le tableau 22 suivant présente les données de ^{13}C -JMOD-RMN et ses corrélations avec le spectre ^1H -RMN obtenues à l'aide du spectre HSQC.

Atome	δ Carbone (ppm)	δ Proton (ppm) (multiplicité, intégration, constante de couplage en Hz)	Type C
1	26,4	1,69 (<i>ddd</i> ; 1H ; 3,7 ; 7,6 ; 7,6)	-CH-
2	17,1	0,94 (<i>m</i> ; 2H)	-CH ₂ -
3	22,5	2,01 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
4	150,1	C _q	C=C
5	62,1	3,01 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
6 b	21,4	2,30 (<i>ddt</i> ; 1H ; 1,9 ; 13,5 ; 16,6)	-CH ₂ -
a		2,73 (<i>ddt</i> ; 1H ; 0,6 ; 3,6 ; 16,9)	
7	148,1	C _q	C=C
8	149,6	C _q	C=C
9	119,9	6,28 (<i>s</i> ; 1H)	C=CH
10	40,1	C _q	-C _q -
11	122,4	C _q	C=C
12	171,2	C _q	C=O
13	8,7	1,94 (<i>se</i> ; 3H)	CH ₃
14	22,2	0,82 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
15 a	106,6	4,82 (<i>d</i> ; 1H ; 2,0)	C=CH ₂
b		5,09 (<i>m</i> ; 1H)	

Tableau 22.- Attributions des carbones et des protons à l'aide du spectre HSQC

Le spectre ^1H -RMN nous a permis d'identifier par similarité avec le spectre des deux molécules précédentes (M1 et M2) les protons de l'exométhylène H-15a et H-15b ainsi que les deux protons blindés H-2 à $\delta_{\text{H}} = 0,94$ ppm qui sortent sous la forme d'un multiplet intégrant pour 2H. De plus nous avons aussi retrouvé le groupement méthyle H-14 ($\delta_{\text{H}} = 0,82$ ppm).

Toutefois, le spectre proton de la molécule M3 montre une différence par rapport à celui de M1. En effet, on observe la disparition des signaux appartenant aux protons H-13 et l'apparition d'un signal à $\delta_{\text{H}} = 1,94$ ppm intégrant pour 3H.

Sur le spectre ^{13}C -JMOD-RMN, nous avons pu identifier par analogie avec le spectre du composé M1, le groupement méthyle C-14, l'exométhylène C-15, le groupe carbonyle C-12 que confirme la présence de la fonction lactone observée en IR. Nous avons aussi confirmé la présence du cyclopropane grâce au carbone blindé C-2 ($\delta_{\text{C}} = 17,1$ ppm).

Toutefois, il existe une différence par rapport à la molécule M1 qui est l'apparition d'un signal fortement blindé appartenant à un groupe méthyle à $\delta_C = 8,7$ ppm (C-13). En tenant compte du déplacement chimique de ce groupe méthyle nous supposons qu'il est porté par une double liaison.

b) Corrélations COSY

Sur le tableau 23 nous avons résumé les données obtenues grâce au spectre COSY.

Atome	δ Proton (ppm)	Corrélations et constantes de couplage en Hz
1	1,69 <i>ddd</i>	2 ; 3
2	0,94 <i>m</i>	3 ; 1
3	2,01 <i>m</i>	2 ; 1
5	3,01 <i>m</i>	6a ; 6b ; 15a ; 15b
6 b	2,30 <i>ddt</i>	6b-6a = 16,6 6b-13 = 1,9 6b-5 = 13,5
6 a	2,73 <i>ddt</i>	6b-6a = 16,6 6a-5 = 3,6 6a-13 = 0,6
9	6,28 <i>s</i>	
13	1,94 <i>se</i>	
14	0,82 <i>s</i>	
15 a	4,82 <i>d</i>	15a-15b = 2
15 b	5,09 <i>m</i>	15a ; 5

Tableau 23.- Corrélations protons-protons obtenus à l'aide du spectre COSY

Nous observons que le spectre COSY est similaire à celui obtenu pour la molécule M1. Nous avons retrouvé le cyclopropane déjà identifié sur les molécules précédentes. Par contre les constantes de couplages de ces corrélations n'ont été pas calculées car ces protons sortent sous la forme de multiplets.

c) Corrélations HMBC

Les données sur les corrélations carbones - protons provenant du spectre HMBC sont résumées sur le tableau 24.

Atome	δ Carbone (ppm)	HMBC (C→H)
1	26,4	H-2 ; H-9 ; H-14
2	17,1	H-14
3	22,5	H-2 ; H-15a ; H-15b
4	150,1	H-2 ; H-15a ; H-15b
5	62,1	H-6a ; H-6b ; H-9 ; H-14 ; H-15a ; H-15b
6	21,4	
7	148,1	H-6a ; H-6b ; H-9 ; H-13
8	149,6	H-6a ; H-9
9	119,9	H-1 ; H-14 (tf)
10	40,1	H-2 ; H-6a ; H-9 ; H-14
11	122,4	H-6a ; H-6b (f) ; H-13
12	171,2	H-13
13	8,7	
14	22,2	H-2
15	106,6	

Tableau 24.- Corrélations carbones-protons obtenus sur le spectre HMBC

d) Attributions des signaux et construction de la molécule

L'attribution des signaux est réalisée à l'aide des données obtenues des spectres HMBC (tableau 24) et COSY (tableau 23). Tout d'abord, sur le spectre COSY nous retrouvons les corrélations existantes entre les protons du cyclopropane c'est-à-dire H1, H2 et H-3. Ce cyclopropane a été déjà décrit sur les deux molécules précédentes. Ces attributions sont confirmées par les corrélations en HMBC entre C-1 et les protons H-2 ainsi que C-3 avec les protons H-2 (cycle A, figure 49a).

Nous retrouvons aussi les corrélations COSY entre H-3 et les deux protons H-15 qui permet l'attribution de C-15. De même, sur le spectre HMBC nous avons identifié les corrélations entre le carbone à $\delta_C = 150,1$ ppm et les protons H-15a, H-15b et H-2 permettant d'attribuer le C-4 (cycle B, fig. 49b).

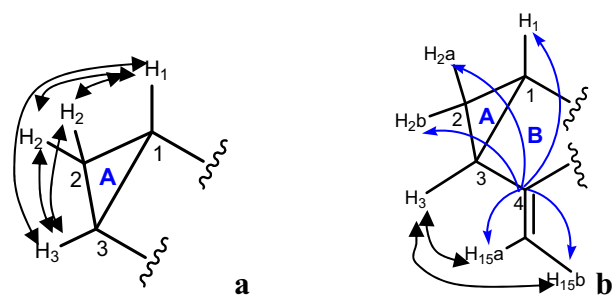
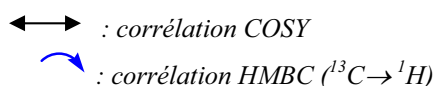


Figure 49.- Corrélations HMBC et COSY



De même, nous avons aussi retrouvé la corrélation entre C-5 ($\delta_{\text{C}} = 62,1$ ppm) et les deux protons H-15. De plus, sur le spectre COSY on observe les corrélations entre les protons H5, H-6a et H-6b permettant l'attribution de C-6. Ensuite, sur le spectre HMBC nous avons identifié la corrélation entre C-1 et H-14 et H-9 ainsi qu'entre C-10 et H-9 et H-14. permettant l'attribution de C-5, C-6, C-9 et C-10 et C-14 (cycle C, figure 50a).

Enfin, nous avons retrouvé les corrélations entre les atomes du cycle D. En effet, les deux protons H-6, les protons H-13 ainsi que H-9 corrélient avec C-7. Ensuite, nous retrouvons les corrélations en HMBC entre C-11 et les protons H-6 et les protons H-13. On retrouve aussi la corrélation entre le carbonyle et les protons H-13. On retrouve aussi la corrélation entre C-8 et les protons H-9 et H-6a (cycle D, figure 50b).

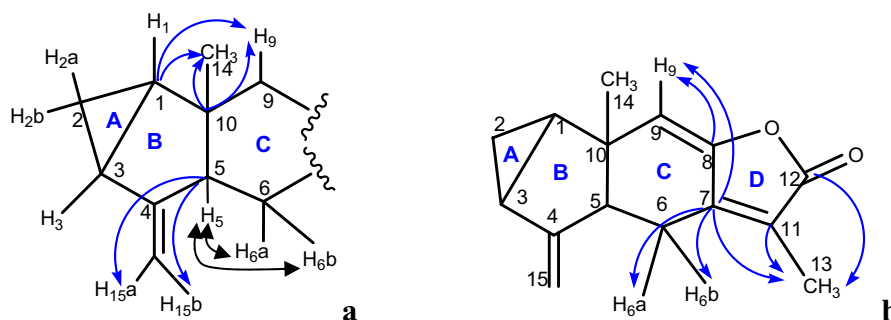
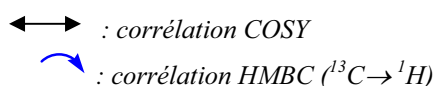


Figure 50.- Corrélations HMBC et COSY



e) Corrélations NOESY

Les données de NOESY sont résumées dans le tableau 25.

Atome	δ Proton (ppm)	NOESY (H \rightarrow H)
1	1,69	H-2 ; H-3 ; H-5 ; H-9
2	0,94	H-1 ; H-3 ; H-14
3	2,01	H-1 ; H-2 ; H-5 ; H-6a ; H-15b
5	3,01	H-1 ; H-3 ; H-6b ; H-6a
6 b	2,30	H-5 ; H-6a ; H-13 ; H-14 ; H-15a
6 a	2,73	H-5 ; H-6B ; H-13 ; H-15a
9	6,28	H-1 ; H-14
13	1,94	H-6a ; H-6b
14	0,82	H-2 ; H-6b ; H-9
15 a	4,82	H-6a ; H-6b ; H-15b
15 b	5,09	H-3 ; H-15a

Tableau 25.- Corrélations obtenues sur le spectre NOESY

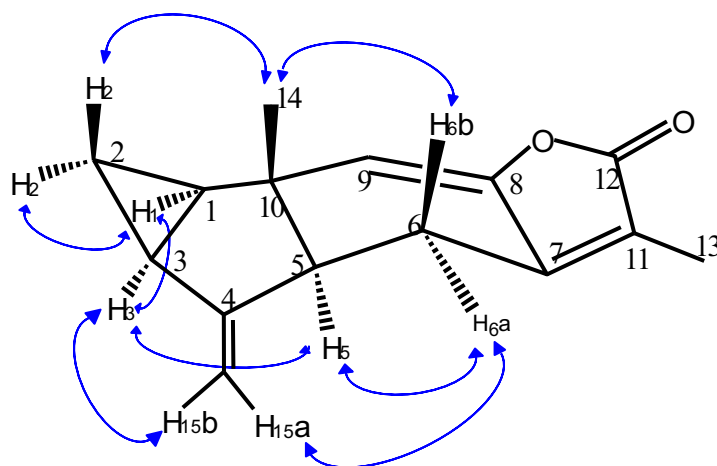


Figure 51.- Corrélations proton-proton : spectre NOESY

L'analyse du spectre NOESY (tableau 25 et figure 51) et des constantes de couplages (tableau 23) nous a permis d'établir la configuration relative de la molécule grâce aux corrélations entre les différents protons. En effet, la constante de couplage entre H5 et H6b (13 Hz) nous indique une conformation de type *trans diaxial* pour ces deux protons.

Il faut remarquer dans ce cas précis que les deux protons H-2 sortent sous forme d'un multiplet. En effet ce signal n'a pas pu être discriminé ni en COSY ni en NOESY. De plus, on observe de la même manière que pour les deux molécules précédentes les corrélations entre les protons du méthyle H-14, le H-6b et les H-2. Ce qui nous amène à supposer que un des protons H-2 fait partie de l'ensemble de protons pseudoaxiaux comme sur les composés M1 et M2.

De plus, nous observons que l'autre proton H-2 corrèle aussi avec les protons H-1 et H-3. De son côté H-3 corrèle avec H-1, H-5 et H-6a. Ces cinq protons se trouvent donc en *anti* des groupes axiaux précédemment définis comme sur les molécules M1 et M2.

Enfin, les protons H-15 gardent les mêmes corrélations décrites pour les M1, la disposition spatiale de la molécule M3 est donc inchangée par rapport à M1.

L'analyse des spectres HSQC, HMBC, COSY et NOESY nous ont permis d'identifier **M3**, comme étant la lactone sesquiterpénique chloranthalactone A ou déhydro-shizukanolide déjà isolée de trois espèces de Chlorantaceae : *Chloranthus glaber* [Takeda *et al.*, 1993], *Sarcandra glabra* [Tsui et Brown, 1996] et *Chloranthus japonicus* [Kawabata *et al.*, 1981]. Les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec les données publiées pour cette molécule (figure 52).

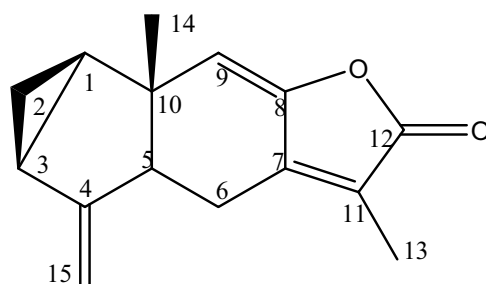


Figure 52.- Structure de M3 : chloranthalactone A ou déhydro-shizukanolide

3.4.- Détermination structurale du composé M4 : Hedyosmone

Le composé **M4** se présente sous la forme d'un solide amorphe jaune pâle. Il se révèle sous l'effet de la vanilline sulfurique montrant une couleur violette, ainsi que sous la lampe à 254 nm, de plus son pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = -27,4^\circ$.

Spectroscopie infra-rouge

Le spectre infrarouge présente des bandes à 3070 cm^{-1} , 1738 cm^{-1} et 1705 cm^{-1} indiquant la présence de, respectivement : un cyclopropane, une fonction ester et une fonction cétone.

Données de spectrométrie de masse

Le spectre de masse haute - résolution enregistré en ESI-Q-TOF-HRMS indique un ion quasi-moléculaire en mode positif m/z 263,1643 $[M+H]^+$ indiquant une formule brute de $C_{16}H_{22}O_3$ ($[M+H]^+$ calculé 263,1647 pour $C_{16}H_{23}O_3$).

Données de Résonance Magnétique Nucléaire

Le spectre RMN du ^{13}C enregistré en J-modulé (^{13}C -JMOD-RMN) indique la présence de 16 atomes de carbones dont 4 carbones quaternaires, 5 groupements CH, 4 méthylènes (CH_2) et 3 méthyle (CH_3).

A ce stade l'ensemble des données obtenues par IR, RMN et par MS nous ont permis de déterminer la présence d'un cyclopropane, d'une fonction cétone et une fonction ester. Ces données permettent de proposer pour la molécule **M4** une formule brute de $C_{16}H_{22}O_3$ et donc un degré d'insaturation de 6.

a) Résonance magnétique du proton et du carbone

Le tableau 26 suivant présente les données de ^{13}C -JMOD-RMN et ses corrélations avec le spectre ^1H -RMN obtenues à l'aide du spectre HSQC.

Atome	δ Carbone (ppm)	δ Proton (ppm) (multiplicité, intégration, constante de couplage en Hz)	Type C
1	27,5	1,45 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
2	16,8	0,87 (<i>m</i> ; 2H)	-CH ₂ -
3	23,4	2,03 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
4	151,4	C _q	C=C
5	62,1	2,95 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
6 b	23,4	1,56 (<i>dd</i> ; 1H ; 12,4 ; 24,4)	-CH ₂ -
a		1,92 (<i>ddd</i> ; 1H ; 3,1 ; 6,8 ; 12,6)	
7	52,2	2,53 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
8	209,7	C _q	C=O
9 a	54,9	2,56 (<i>m</i> ; 1H)	-CH ₂ -
b		2,65 (<i>dd</i> ; 1H ; 5,3 ; 13,5)	
10	40,3	C _q	-C _q -
11	38,0	2,96 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
12	175,4	C _q	O-C=O
13	13,7	1,23 (<i>d</i> ; 3H ; 7,3)	CH ₃
14	18,9	0,59 (<i>se</i> ; 3H)	CH ₃
15 a	106,1	4,72 (<i>m</i> ; 1H)	C=CH ₂
b		5,03 (<i>m</i> ; 1H)	
16	51,6	3,68 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃

Tableau 26.- Attributions des carbones et des protons à l'aide du spectre HSQC

Le spectre ^1H -RMN a été analysé par similarité avec le spectre du composé M3. En effet nous avons retrouvé les protons blindés H-2 qui sortent sous la forme d'un multiplet à $\delta_{\text{H}} = 0,87$ ppm intégrant pour 2H. De plus nous avons pu identifier les protons de l'exométhylène (H-15a $\delta_{\text{H}} = 4,72$ ppm et H-15b $\delta_{\text{H}} = 5,03$ ppm) ainsi que le groupement méthyle H-14 à $\delta_{\text{H}} = 0,59$ ppm.

Toutefois, nous observons des différences sur le spectre proton du composé M4 par rapport à celui de M3. En effet, nous identifions deux signaux supplémentaires intégrant pour 3H chacun par rapport au composé M3, un singulet à $\delta_{\text{H}} = 3,68$ ppm et un doublet dédoublé à $\delta_{\text{H}} = 1,23$ ppm. Leurs déplacements chimiques respectifs nous font supposer qu'il s'agit d'un groupement méthoxy O-CH₃ pour le premier et d'un méthyle pour le deuxième.

Ensuite, nous observons la disparition du proton H-9 à $\delta_{\text{H}} = 6,28$ ppm, mais, on identifie à la place deux protons intégrant chacun pour 1H à $\delta_{\text{H}} = 2,65$ ppm et à $\delta_{\text{H}} = 2,56$

ppm. De plus, nous avons aussi remarqué deux nouveaux signaux : deux multiplets intégrant chacun pour 1H, à $\delta_H = 2,96$ ppm et à $\delta_H = 2,53$ ppm.

Sur le spectre ^{13}C -JMOD-RMN, nous avons pu identifier par analogie avec le spectre du composé précédent M3, le groupement méthyle C-14, l'exométhylène C-15. Nous avons aussi confirmé la présence du cyclopropane grâce à la présence d'un multiplet blindé ($\delta_H = 0,87$ ppm) porté par le C-2 ($\delta_C = 16,8$ ppm).

Toutefois nous remarquons des différences par rapport à la molécule M3. En effet, nous avons identifié la disparition des deux signaux des carbones quaternaires C-7 et C-11 et l'apparition des deux signaux CH à $\delta_C = 52,2$ ppm et à $\delta_C = 38,0$ ppm. De plus, nous identifions le groupe carbonyle C-12 ($\delta_C = 175,4$ ppm) qui confirme la présence de la fonction ester et le carbonyle C-8 de la fonction cétone ($\delta_C = 209,7$ ppm). Ces deux fonctions ont été observées en IR. Ces données sont observables sur la figure 53.

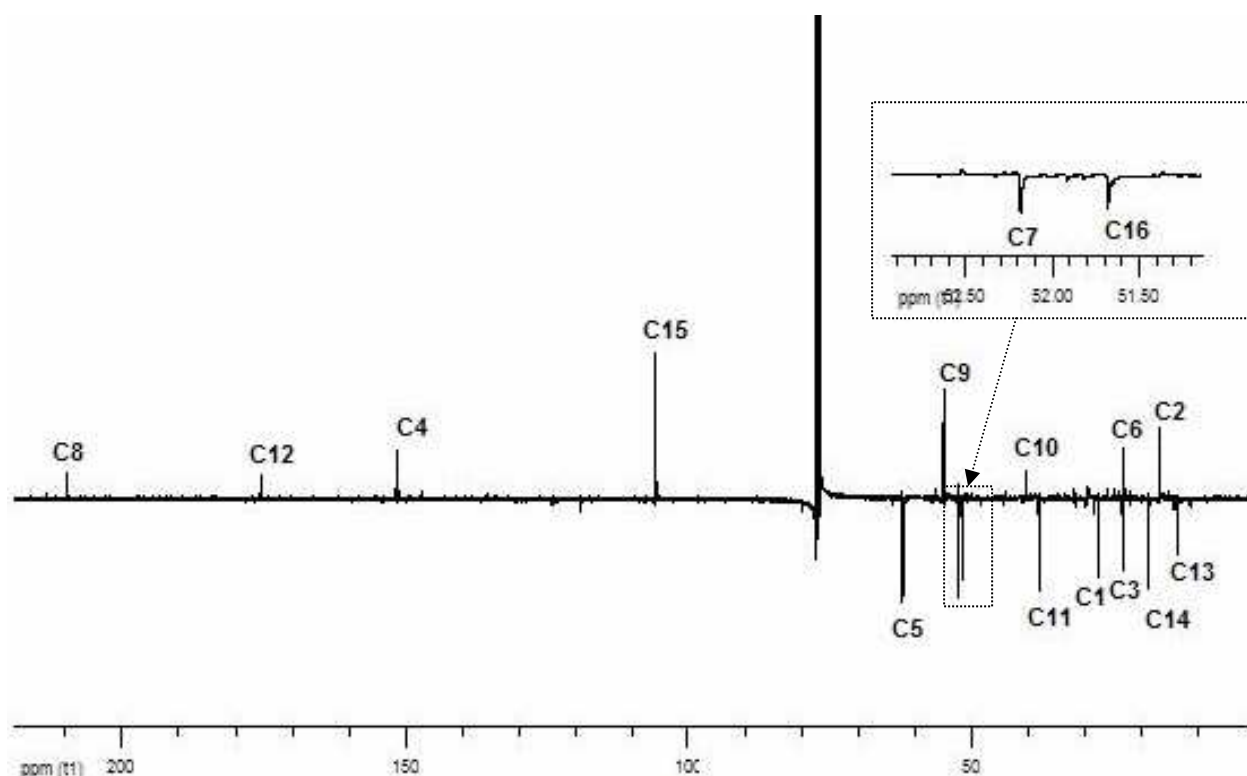


Figure 53.- Spectre RMN- ^{13}C du composé M4 dans le CDCl_3

b) Corrélations COSY

Sur le tableau 27 nous avons résumé les données obtenues grâce au spectre COSY.

Atome	δ Proton (ppm)	Corrélations et constantes de couplage en Hz
1	1,45 <i>m</i>	2 ; 3
2	0,87 <i>m</i>	1 ; 3
3	2,03 <i>m</i>	1 ; 2
5 ou 11	2,95 <i>m</i>	6a ; 6b ; 7 ; 15a (tf) ; 15b (tf)
6 b	1,56 <i>dd</i>	6a-6b = 12,4 ; 7 ; 5
6 a	1,92 <i>ddd</i>	6b-6a = 12,6 ; 7 ; 5
7	2,53 <i>m</i>	6a ; 6b ; 5 ou 11 (ambiguïté entre 5 et 11)
9 a	2,56 <i>m</i>	9b ; 7 (ambiguïté entre 7 et 9a)
9 b	2,65 <i>dd</i>	9b- 9a ; 9b-7 (ambiguïté entre 7 et 9a)
11 ou 5	2,96 <i>m</i>	13
13	1,23 <i>d</i>	13-11 = 7,4
14	0,59 <i>se</i>	9a (tf)
15 a	4,72 <i>m</i>	15b ; 5 (f)
15 b	5,03 <i>m</i>	15a ; 5 (f)
16	3,68 <i>s</i>	

Tableau 27.- Corrélations protons-protons obtenus à l'aide du spectre COSY

Nous avons pu retrouver les corrélations entre H-1, H-3 et les protons H-2. Ce qui nous permet de conclure à l'existence du cyclopropane déjà identifié sur les molécules précédentes, mais les constantes de couplage de ces corrélations n'ont été pas calculées car ces protons sortent sous la forme de multiplets. En ce qui concerne H-7 et H-9a ainsi que H-5 et H-11, ils possèdent des déplacements chimiques et des multiplicités similaires ne permettant pas de les discriminer.

c) Corrélations HMBC

Les données sur les corrélations carbones - protons provenant du spectre HMBC sont résumées sur le tableau 28.

Atome	δ Carbone (ppm)	HMBC (C→H)
1	27,5	H-9 ; H-14
2	16,8	H-14
3	23,4	H-15a ; H-15b
4	151,4	H-2 ; H-5 ; H-15a ; H-15b
5	62,1	H-6a ; H-6a ; H-9a ; H-9b ; H-14 ; H-15a ; H-15b
6	23,4	H-5 (f) ; H-15a ; H-15b
7	52,2	H-6a ; H-6a (f) ; H-9b (f) ; H-11 ; H-13
8	209,7	
9	54,9	H-7 (f) ; H-14
10	40,3	H-5 ; H-6a ; H-9a ; H-9b ; H-14
11	38,0	H-13
12	175,4	H-7 ; H-11 ; H-13 ; H-16
13	13,7	H-11
14	18,9	H-9a ; H-9b
15	106,1	
16	51,6	

Tableau 28.- Corrélations carbones-protons obtenues sur le spectre HMBC

d) Attributions des signaux et construction de la molécule

L'attribution des signaux est réalisée à l'aide des données obtenues des spectres HMBC (tableau 28) et COSY (tableau 27). Le spectre COSY nous a permis de retrouver les corrélations existantes au niveau du cyclopropane observé sur les molécules précédentes. C'est-à-dire les corrélations entre H-1, H-2 et H-3 (cycle A, figure 54a).

Nous retrouvons aussi les corrélations HMBC entre C-3 et les deux protons H-15 qui permet l'attribution de C-15 ($\delta_C = 106,1$ ppm). De plus, nous identifions les corrélations entre C-4 et les protons H-15a, H-15b et H-2 ce qui nous permet d'attribuer le carbone C-4 ($\delta_C = 151,4$ ppm) (cycle B, figure 54b).

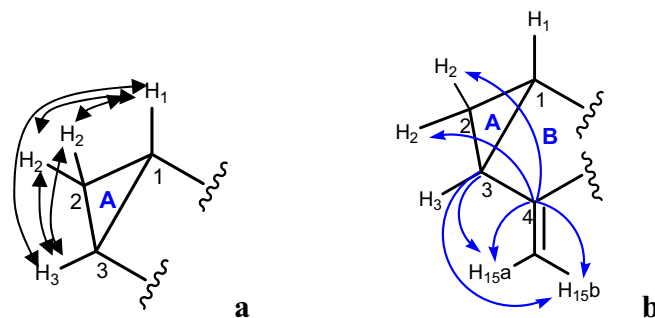


Figure 54.- Corrélations HMBC et COSY

\longleftrightarrow : corrélation COSY
 \curvearrowright : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

De la même manière, nous avons pu retrouver les corrélations précédentes au niveau du cycle C. En effet, sur le spectre COSY nous avons identifié les corrélations entre les protons H-15 et le H-5 et aussi les corrélations entre H-5 et les protons H-6. Sur le HMBC nous retrouvons la corrélation entre C-5 et les protons H-15a et H-15b. Ces données nous permettent d'attribuer C-5 et C-6. De plus on retrouve les corrélations entre C-1 et H-9a et H-14 et ainsi qu'entre C-10 avec les protons H-5, H-9a, H-9b, H-6a et H-14. Ces données nous ont permis d'attribuer les carbones C-9 et C-10 et C-14 (cycle C, figure 55a).

Le spectre HMBC nous permet aussi d'identifier les corrélations entre les protons H-6 avec C-7 ($\delta_{\text{C}} = 52,2$ ppm). Ce dernier carbone corrèle en HMBC aussi avec H-11, H-13 et faiblement avec H-9b. De plus, ces deux derniers protons (H-11 et H-13) corrèlent aussi avec deux carbones, un à $\delta_{\text{C}} = 175,4$ ppm et l'autre à $\delta_{\text{C}} = 13,7$ ppm. Ces données nous permettent l'attribution de C-11, C-12 et C-13. De plus, le C-12 corrèle avec le proton deblindé à $\delta_{\text{H}} = 3,68$ ppm, appartenant au méthoxy ce qui implique la présence d'un ester méthylique observé de plus en IR. Enfin, le carbone à $\delta_{\text{C}} = 209,7$ ppm quant à lui est attribué vu son déplacement chimique comme C-8 carbonyle de la fonction cétone (figure 55b).

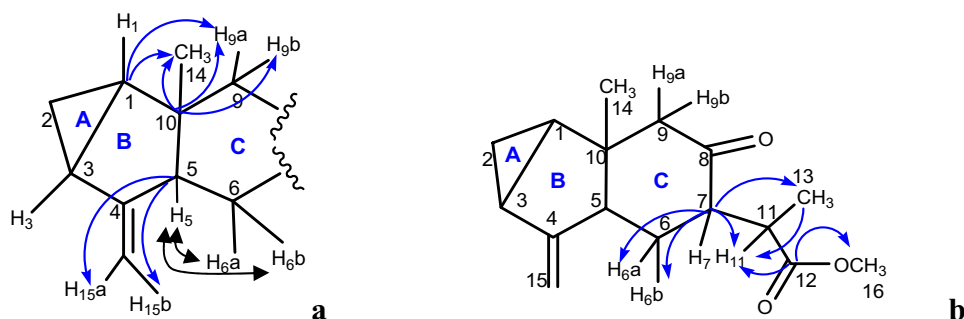


Figure 56.- Corrélations HMBC et COSY

\longleftrightarrow : corrélation COSY
 \curvearrowright : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

L'analyse des spectres HSQC, HMBC et COSY nous ont permis d'identifier et d'élucider la structure de **M4** (figure 56). Donc nous pouvons dire que **M4** est un sesquiterpène qui est pour la première fois isolé d'une source végétale, mais qui a déjà été obtenu comme un mélange de diastéréomères par hydrolyse du shizukanolide [Kawabata *et al.*, 1981].

Il faut remarquer que contrairement aux structures précédentes, il existe un degré de liberté beaucoup plus important des carbones C-11, C-12 et C-13. On observe aussi que les carbones C-7 et C-11 sont des carbones asymétriques. Malheureusement, des expériences de NOESY n'auraient pas pu nous renseigner plus sur sa stéréochimie en C11 à cause de la libre rotation énoncée précédemment.

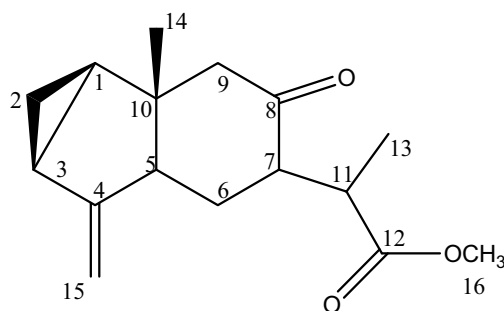


Figure 56.- Structure de M4, hedyosmone

3.5.- Détermination structurale du composé M5 : Bolivianine

Le composé **M5** se présente sous la forme d'une huile beige clair. Il se révèle sous l'effet de la vanilline sulfurique montrant une couleur bleue foncée, ainsi que sous la lampe U.V. à 254 nm, de plus son pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = -50,0^\circ$.

Spectroscopie infra-rouge

Le spectre infrarouge présente des bandes à 3070 cm^{-1} , 1752 cm^{-1} , 1215 et 1029 cm^{-1} , indiquant la présence de, respectivement : un cyclopropane, une γ lactone β insaturée et une fonction éther d'énol.

Données de spectrométrie de masse

Le spectre de masse haute - résolution enregistré en ESI-Q-TOF-HRMS indique un ion quasi-moléculaire en mode positif m/z 379.2285 $[M+H]^+$ indiquant une formule brute de $C_{25}H_{30}O_3$ ($[M+H]^+$ calculé 379.2273 pour $C_{25}H_{31}O_3$).

Données de Résonance Magnétique Nucléaire

Le spectre RMN du ^{13}C enregistré en J-modulé (^{13}C -JMOD-RMN) indique la présence de 25 atomes de carbones dont 8 carbones quaternaires, 8 groupements CH, 5 méthylènes (CH_2) et 4 fonctions méthyle (CH_3).

L'ensemble des données obtenues par IR, RMN, et par MS nous ont permis de déterminer la présence d'une fonction γ lactone β insaturée, ainsi que d'une fonction éther d'énol. Ces données permettent de proposer pour la molécule M5 une formule brute de $C_{25}H_{30}O_3$ et donc un degré d'insaturation de 11.

a) Résonance magnétique du proton et du carbone

Le tableau 29 suivant présente les données de ^{13}C -JMOD-RMN et ses corrélations avec le spectre ^1H -RMN obtenues à l'aide du spectre HSQC.

Atome	δ Carbone (ppm)	δ Proton (ppm) (multiplicité, intégration, constante de couplage en Hz)	Type C
1	26,1	1,46 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
2 a	16,3	0,70 (<i>ddd</i> ; 1H ; 5,1 ; 8,4 ; 9,0)	-CH ₂ -
b		0,91 (<i>dt</i> ; 1H ; 3,6 ; 5,1)	
3	23,6	1,94 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
4	152,9	C _q	C=C
5	52,1	2,56 (<i>dde</i> ; 1H ; 2,2 ; 12,6)	-CH-
6 b	26,2	1,35 (<i>dd</i> ; 1H ; 12,6 ; 14,2)	-CH ₂ -
a		1,94 (<i>dd</i> ; 1H ; 2,2 ; 14,2)	
7	52,6	C _q	-Cq-
8	96,9	C _q	-Cq-O
9	46,6	2,30 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
10	39,8	C _q	-Cq-
11	110,4	C _q	C=C
12	168,5	C _q	C=O
13	149,4	7,39 (<i>s</i> ; 1H)	C=CH
14	20,5	1,00 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
15 a	105,4	4,74 (<i>se</i> ; 1H)	C=CH ₂
b		5,18 (<i>m</i> ; 1H)	
16 a	23,4	1,75 (<i>m</i> ; 1H)	-CH ₂ -
b		2,27 (<i>m</i> ; 1H)	
17	120,5	5,64 (<i>m</i> ; 1H)	CH=C
18	140,0	C _q	C=C
19	51,6	2,63 (<i>dd</i> ; 1H ; 8,1 ; 12,0)	-CH-
20 a	35,4	1,10 (<i>m</i> ; 1H)	-CH ₂ -
b		2,07 (<i>ddd</i> ; 1H ; 6,8 ; 12,0 ; 14,0)	
21	44,3	1,69 (<i>dd</i> ; 1H ; 6,8 ; 11,0)	-CH-
22	78,4	C _q	-Cq-
23	27,2	1,16 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
24	27,3	1,02 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
25	22,5	1,62 (<i>se</i> ; 3H)	CH ₃

Tableau 29.- Attributions des carbones et des protons à l'aide du spectre HSQC

Par similarité avec le spectre de la molécule M1, le spectre ^1H -RMN de la molécule M5 nous a permis de retrouver le groupement méthyle H-14 ainsi que les deux protons blindés H-2a ($\delta_{\text{H}} = 0,70$ ppm) et H-2b ($\delta_{\text{H}} = 0,91$ ppm). De plus, on observe les protons de l'exométhylène H-15a ($\delta_{\text{H}} = 4,74$ ppm) et H-15b ($\delta_{\text{H}} = 5,18$ ppm) (figure 57).

Toutefois, le spectre proton de la molécule M5 montre une différence significative par rapport à celui de M1. En effet, on observe deux signaux aisément identifiables sur le spectre

proton, un singulet à $\delta_H = 7,39$ ppm et un multiplet à $\delta_H = 5,64$ ppm intégrant chacun pour 1H. Ces deux signaux correspondent à des protons alcéniques dont celui à $\delta_H = 7,39$ ppm est plus déblindé ce qui peut être dû à la présence en α d'un oxygène.

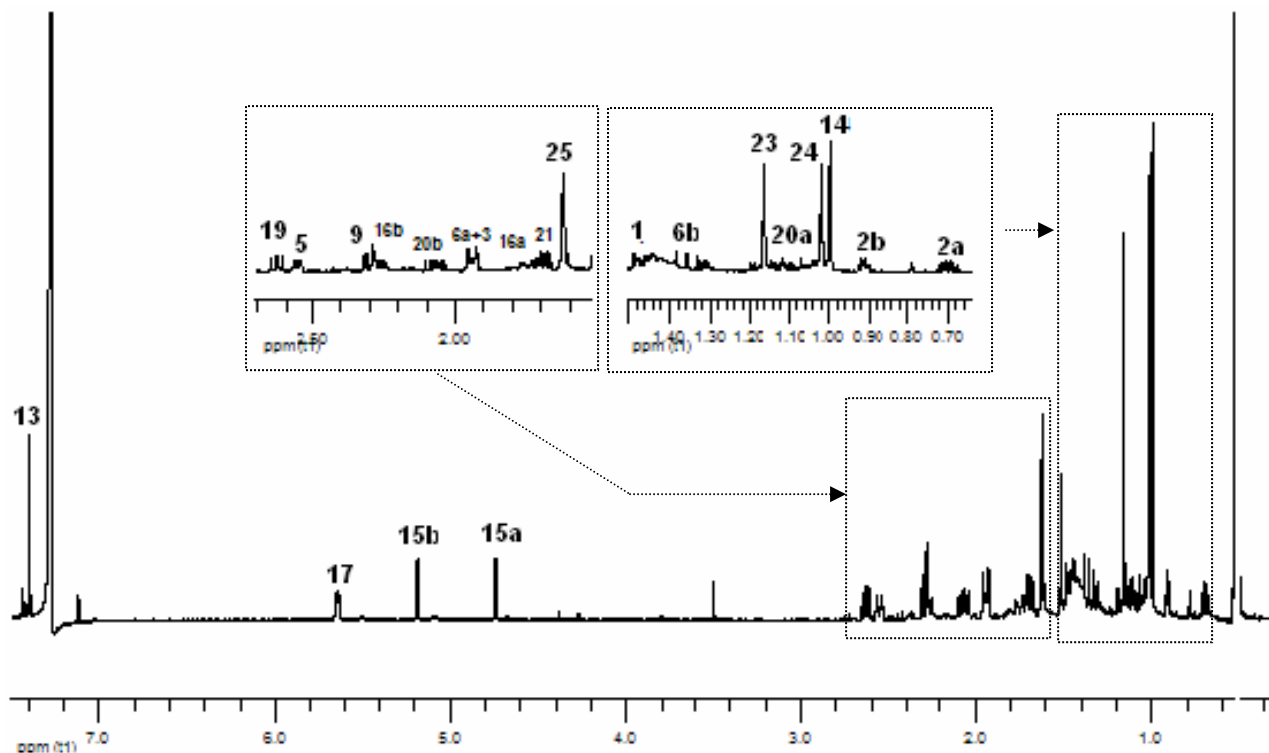


Figure 57.- Spectre RMN 1H du composé M5 dans le C_6D_6

Sur le spectre ^{13}C -JMOD-RMN nous avons pu identifier par analogie avec le spectre du composé M1, le groupement méthyle C-14 ($\delta_C = 20,5$ ppm), l'exométhylène C-15 ($\delta_C = 105,4$ ppm), le groupe carbonyle C-12 ($\delta_C = 168,5$ ppm) que confirme la présence de la fonction lactone observée en IR. Nous avons aussi confirmé la présence du cyclopropane grâce à la présence des protons blindés H-2a ($\delta_H = 0,70$ ppm) et H-2b ($\delta_H = 0,91$ ppm) porté par le C-2 ($\delta_C = 16,3$ ppm) (figure 58).

Toutefois une différence notable par rapport à la molécule M1 apparaît ici aussi. En effet, on observe un signal à $\delta_C = 149,4$ ppm. Vu la valeur de son déplacement chimique, nous supposons que ce carbone fait partie de la fonction éther d'énol détectée sur l'IR.

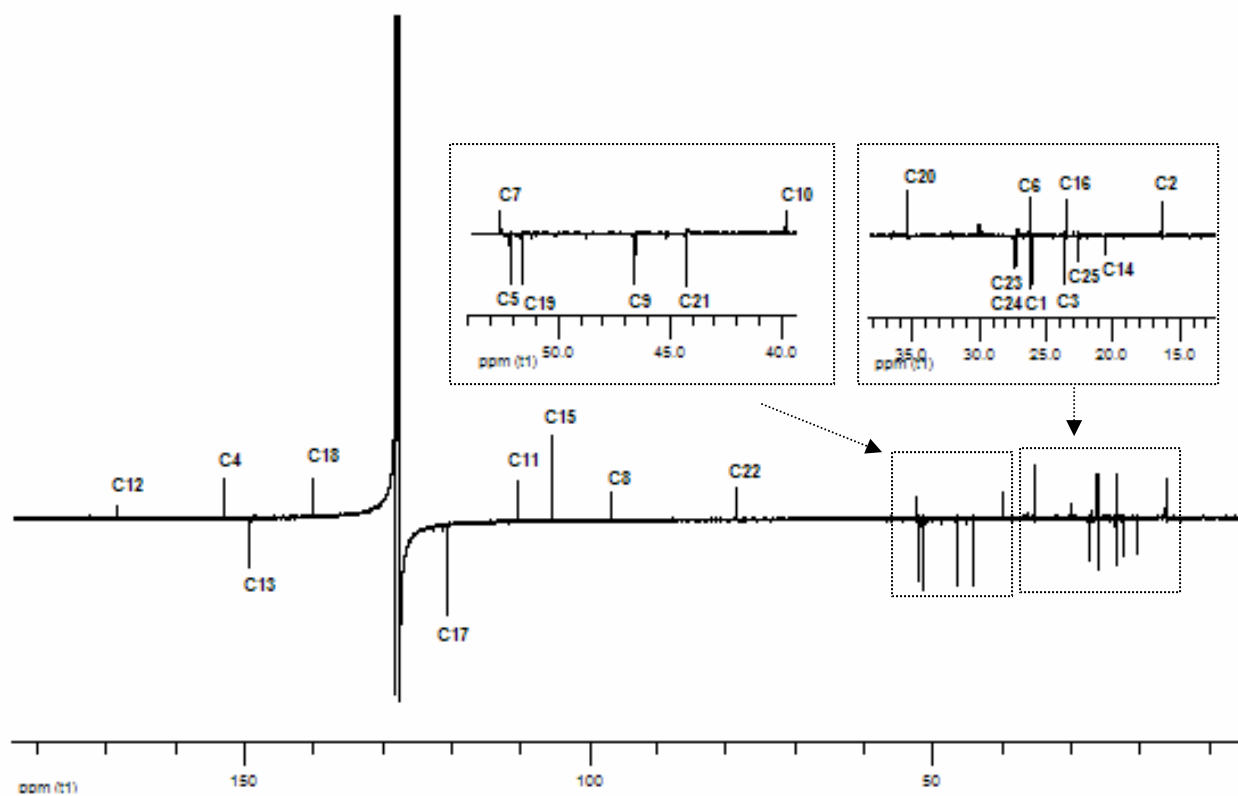


Figure 58.- Spectre RMN ^{13}C du composé M5 C_6D_6

b) Corrélations COSY

Sur le tableau 30 nous avons résumée les données obtenues sur le spectre COSY.

Atome	δ Proton (ppm)	Corrélations et constantes de couplage en Hz
1	1,46 <i>m</i>	2a ; 2b ; 3
2 a	0,70 <i>ddd</i>	2a-2b = 5,1 2a-3 = 9,0 2a-1 = 8,4
2 b	0,91 <i>dt</i>	2b-3 = 3,6 2b-1 = 3,6 2b-2a = 5,1
3	1,94 <i>m</i>	1 ; 2a ; 2b
5	2,56 <i>dde</i>	5-6b = 12,6 5-6a = 2,2
6 b	1,35 <i>dd</i>	6b-6a = 14,2 6b-5 = 12,6
6 a	1,94 <i>dd</i>	6a-6b = 14,2 6a-5 = 2,2
9	2,30 <i>m</i>	16a; 16b
13	7,39 <i>s</i>	
14	1,00 <i>s</i>	
15 a	4,74 <i>se</i>	15b ; 5(f)
15 b	5,18 <i>m</i>	15a ; 5(f)
16 a	1,75 <i>m</i>	16b ; 9
16 b	2,27 <i>m</i>	16a ; 9 ; 17
17	5,64 <i>m</i>	16b ; 25
19	2,63 <i>dd</i>	19-20a = 8,1 19-20b = 12,0
20 a	1,10 <i>m</i>	19 ; 20b ; 21
20 b	2,07 <i>ddd</i>	20b-19 = 12,0 20b-20a = 14,0 20b-21 = 6,8
21	1,69 <i>dd</i>	21-20a = 11,0 21-20b = 6,8
23	1,16 <i>s</i>	
24	1,02 <i>s</i>	
25	1,62 <i>se</i>	17

Tableau 30.- Corrélations protons – protons obtenus à l'aide du spectre COSY

Nous avons pu retrouver les corrélations entre H-1, H-3 et les protons H-2. Ce qui nous permet de conclure à l'existence du cyclopropane déjà identifié sur les molécules précédentes. Par contre les constantes de corrélations n'ont été pas calculées car ces protons sortent sous la forme de multiplets.

c) Corrélations HMBC

Les données sur les corrélations carbone-proton provenant du spectre HMBC sont détaillées sur le tableau 31.

Atome	δ Carbone (ppm)	HMBC (C→H)
1	26,1	H-14
2	16,3	H-14
3	23,6	H-2a ; H-15a ; H-15b
4	152,9	H-2a ; H-5 ; H-15a ; H-15b
5	52,1	H-6b ; H-6a ou/et H-3 ; H-14 ; H-15a ; H-15b
6	26,2	H-14 ; H-21
7	52,6	H-6b ; H-6a ; H-13b ; H-21
8	96,9	H-6a ; H-9 ; H-19 ; H-20b
9	46,6	H-14 ; H-16b ; H-17 ; H-19
10	39,8	H-2a ; H-2b ; H-5 ; H-6b ; H-6a ou/et H-3 ; H-9 (f) ; H-14
11	110,4	H-6b ; H-13 ; H-21
12	168,5	H-13
13	149,4	
14	20,5	H-9 (f)
15	105,4	
16	23,4	H-9 ; H-17
17	120,5	H-16a ; H-16b ; H-19 ; H-25
18	140,0	H-16a (f) ; H-16b ; H-19 ; H-20a ; H-20b (f) ; H-25
19	51,6	H-17 ; H-20a ; H-20b ; H-25
20	35,4	H-19 ; H-21 ; H-25 (f)
21	44,3	H-6a ; H-6b ; H-20b ; H-23 ; H-24
22	78,4	H-13 ; H-20b ; H-23 ; H-24
23	27,2	H-24
24	27,3	H-23
25	22,5	H-17 ; H-19

Tableau 31.- Corrélations carbonés – protons obtenus sur le spectre HMBC

d) Attributions des signaux et construction de la molécule

L'attribution des signaux est réalisée à l'aide des données obtenues des spectres HMBC (tableau 31) et COSY (tableau 30). En effet, sur le spectre COSY nous retrouvons les corrélations entre les protons du cyclopropane c'est-à-dire H1, H2a, H-2b et H-3. Ce cyclopropane a été déjà décrit sur les molécules précédentes. De plus sur le spectre HMBC nous avons identifié les corrélations entre le carbone C-3 et les protons de l'exométhylène H-15a et H-15b ce qui nous permet d'attribuer le C-15. Ces deux derniers protons corrélerent en HMBC avec le carbone à $\delta_C = 152,9$ ppm nous permettant d'attribuer le C-4 qui corréle aussi avec les protons H-2a et H-5 (cycle A, figure 59a).

Sur le spectre COSY on retrouve les corrélations entre H-5, H-6a et H-6b permettant l'attribution de C-6 (cycle A, figure 59b). De la même manière, sur le spectre HMBC nous avons pu retrouver les corrélations décrites pour les molécules précédentes au niveau du cycle C. Grâce à cela, nous avons pu attribuer le C-9, C-10 et C-14 (cycle C, figure 59b).

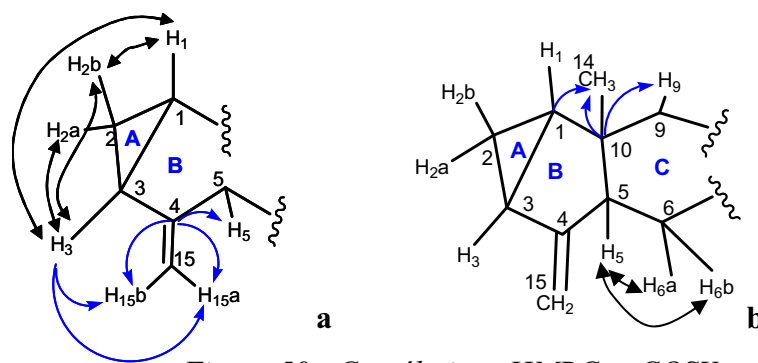


Figure 59.- Corrélations HMBC et COSY

↔ : corrélation COSY
 ↗ : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

Nous avons identifié sur le spectre HMBC la corrélation entre les deux protons H-6 avec le carbone à $\delta_{\text{C}} = 52,6$ ppm, ce qui nous laisse supposer qu'il s'agit du carbone C-7. De plus ce carbone corrèle en HMBC avec H-21 qui à son tour va corrélérer en COSY avec H-20a et H-20b. De même sur le spectre COSY les deux protons H-20 corrèlent avec le proton H-19. L'ensemble de ces données nous ont permis d'attribuer le C-21, C-20 et C-19. Ces attributions sont confirmées par le spectre HMBC car le C-20 corrèle avec les protons H-21 et H-19. Quant au C-21 il corrèle avec H-6a, H-6b et H-20b. En ce qui concerne le C-19, il corrèle avec H-20a et H-20b. Enfin, le carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 96,9$ ppm corrèle en HMBC avec H-9, H-19, H-6a et H-20b ce qui nous a permis de l'attribuer comme C-8 (cycle F, figure 60).

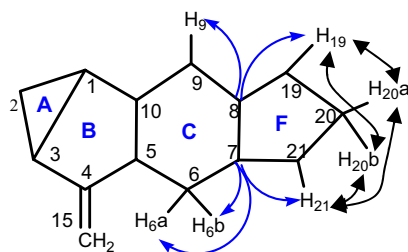


Figure 60.- Corrélations HMBC et COSY

↔ : corrélation COSY
 ↗ : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

Sur le spectre COSY on identifie la corrélation entre le proton H-9 et les protons H-16a et H-16b, ceci nous permet d'attribuer le C-16. Le carbone C-16 sur le spectre HMBC corrèle avec H-9 et H-17, de son côté le proton H-17 corrèle sur le COSY avec le H-16b permettant de l'attribuer comme C-17. Sur le spectre COSY ce même proton H-17 corrèle avec le proton H-25, ce qui nous a permis de placer le groupement méthyle C-25. Ces attributions sont confirmées par les corrélations en HMBC du carbone C-17 (carbone hybridé sp^2) avec les protons H-19, H-16a, H-16b et H-25.

Quant au carbone quaternaire hybridé sp^2 à $\delta_C = 140,0$ ppm, il corrèle sur le spectre HMBC avec H-19, H-25, ainsi qu'avec les protons H-20 et H-16 ce qui nous permet de l'attribuer au C-18 (cycle E, figure 61).

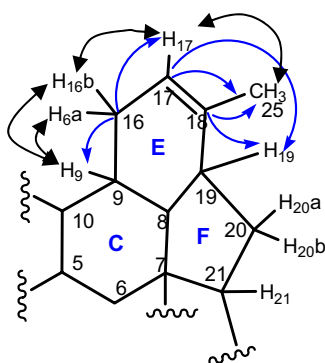
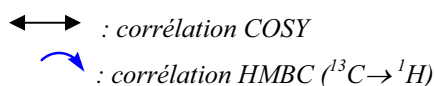


Figure 61.- Corrélations HMBC et COSY



Comme nous avons pu le remarquer sur le spectre HMBC le carbone C-21 corrèle aussi avec les protons des groupes méthyles H-23 ($\delta_H = 1,16$ ppm) et H-24 ($\delta_H = 1,02$ ppm). Quant à ces groupes méthyles ils corrèlent en HMBC entre eux et avec le carbone à $\delta_C = 78,4$ ppm permettant l'attribution de C-22. Ce dernier carbone corrèle aussi avec H-20b (figure 62).

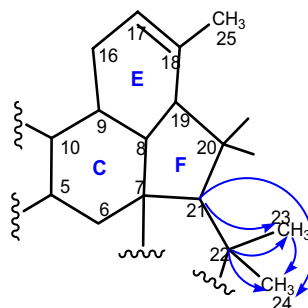


Figure 62.- Corrélations HMBC et COSY



Sur le spectre HMBC on observe que le C-7 corrèle aussi avec H-21 ainsi qu'avec le proton à $\delta_H = 7,39$ ppm qui est porté par un carbone de la fonction éther d'énol C-13 ($\delta_C = 149,4$ ppm), ceci nous permet de placer cette fonction. Cette attribution est confirmée par la corrélation entre H-13 et C-22. Ce proton H-13 corrèle aussi avec le carbone à $\delta_C = 110,4$ ppm permettant de placer le C-11 qui pour sa part corrèle avec les protons H-6b et H-21. Quant au carbonyle à $\delta_C = 168,5$ ppm (C-12), il corrèle avec H-13 permettant de placer la fonction lactone détectée en IR (cycle G, figure 63).

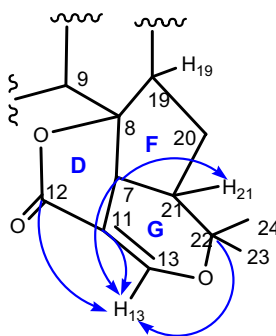
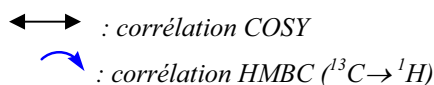


Figure 63.- Corrélations HMBC et COSY



Nous avons donc déterminé la structure de M5, un sesterpène polycyclique original que nous avons nommé Bolivianine (figure 64).

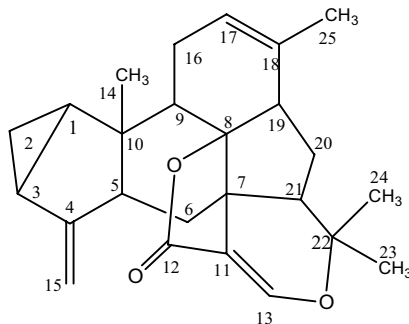


Figure 64.- Structure complète de la molécule M5 : Bolivianine

e) Corrélations NOESY

Les données de NOESY sont résumées dans le tableau 32.

Atome	δ Proton (ppm)	NOESY (H→H)
1	1,46	H-2a ; H-3 ou H-6a ; H-9 ; H-16b
2 a	0,70	H-1 ; H-2b ; H-3 ou H-6a
2 b	0,91	H-2a ; H-14
3 ou 6a	1,94	H-1 ; H-2a ; H-5 ; H-6b ; H-15a ; H-23
5	2,56	H-3 ou H-6a ; H-16b ; H-21
6 b	1,35	H-3 ou H-6a ; H-14
6a ou 3	1,94	H-1 ; H-2a ; H-5 ; H-6b ; H-15a ; H-23
9	2,30	H-1 ; H-14
13	7,39	
14	1,00	H-2b ; H-6b ; H-9
15 a	4,74	H-3 ou H-6a ; H-15b
15 b	5,18	H-15a
16 a	1,75	H-5 ; H-16b
16 b	2,27	H-1 ; H-16a ; H-17
17	5,64	H-16b ; H-25
19	2,63	H-20b ; H-25
20 a	1,10	H-20b ; H-21
20 b	2,07	H-19 ; H-20a ; H-24
21	1,69	H-5 ; H-20a ; H-23 ; H-24
23	1,16	H-3 ou H-6a ; H-21 ; H-24
24	1,02	H-20b ; H-21 ; H-23
25	1,62	H-17 ; H-19

Tableau 32.- Corrélations obtenues sur le spectre NOESY

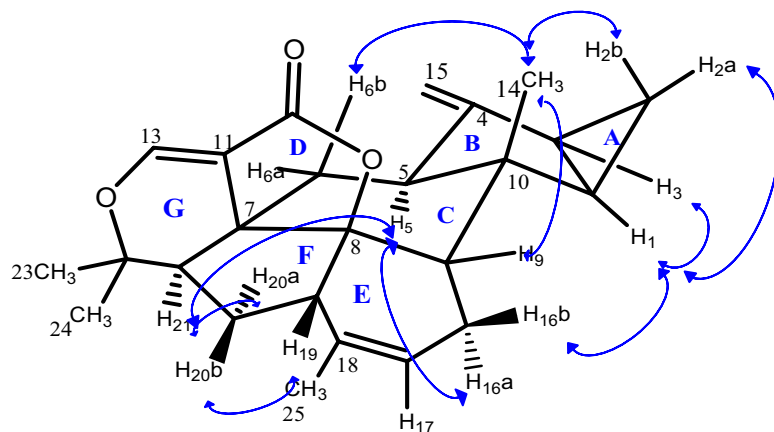


Figure 65.- Corrélations proton-proton : spectre NOESY

L'analyse du spectre NOESY (tableau 32 et figure 65) et des constantes de couplages (tableau 30) nous a permis d'établir la configuration relative de la molécule M5.

On observe que le proton H-1 corrèle avec les protons H-3 et H-2a, ce qui signifie que ces trois protons sont en *syn* sur le cycle A. Les protons de la fonction méthyle C-14 corrèlent

avec H-2b, ce qui signifie que ce groupe de protons est en *anti* par rapport aux protons H-1 et H-3 sur le cycle B. Nous avons ensuite déterminé la stéréochimie relative des protons du cycle C. En effet, comme nous l'avons vu sur les molécules précédentes la constante de couplage entre H-5 et H-6b (12,9 Hz) nous indique une conformation de type *trans diaxial*. Le groupement méthyle C-14, quant à lui, corrèle aussi avec le proton H-6b, ce qui confirme qu'il est lui aussi axial, et indique une position *anti* par rapport au proton H-5. Le méthyle C-14 corrèle aussi avec H-9, indiquant que ce dernier est équatorial pour le cycle C.

Par conséquent, la liaison entre le C-9 et le C-16 est axiale, ce qui est confirmé par la corrélation entre H-5 et H-16a et qui implique que la liaison entre C-8 et C-19 est équatoriale du fait de la jonction des cycles C et E. Si la liaison entre C-8 et C-19 est équatoriale, alors la liaison C8-O est axiale et la liaison entre C-7 et C-11 est équatoriale, en *syn* par rapport à la fonction méthyle C-14. Cela est confirmé par la corrélation entre les protons H-21 et H-5.

De plus, le proton H-21 corrèle avec H-20a, de même H-19 corrèle avec H-20b, ce qui implique que les protons H-19 et H-21 sont en *anti* sur le cycle F. De plus, H-21 corrèle avec le proton H-5, pointant donc vers H5, ceci nous permet de déterminer la configuration relative de C-19 et C-21.

L'analyse des spectres HSQC, HMBC COSY et NOESY nous a permis d'identifier et d'élucider la structure de **M5**. Donc nous pouvons dire que la molécule **M5** est une nouvelle structure, un sesterpène qui est pour la première fois isolé. Nous avons également établi la configuration relative de la Bolivianine (figure 66).

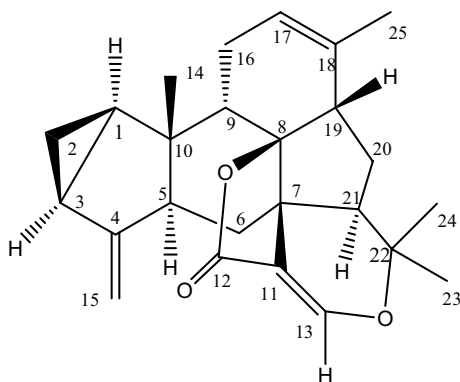


Figure 66.- Structure de M5, bolivianine

3.6.- Détermination structurale du composé M6 : Isobolivianine

Le composé **M6** se présente sous la forme d'une huile beige clair. Il se révèle sous l'effet de la vanilline sulfurique montrant une couleur bleue foncée, ainsi que sous la lampe U.V. à 254 nm, de plus son pouvoir rotatoire est $\alpha_D = -80,0^\circ$.

Spectroscopie infra-rouge

Le spectre infrarouge présente des bandes à 3070 cm^{-1} , 1755 cm^{-1} , 1226 et 1028 cm^{-1} , indiquant la présence de, respectivement : un cyclopropane, une γ lactone β insaturée et une fonction éther d'énol.

Données de spectrométrie de masse

Le spectre de masse haute - résolution enregistré en ESI-Q-TOF-HRMS indique un ion quasi-moléculaire en mode positif m/z 379.2258 $[M+H]^+$ correspondant à une formule brute de $C_{25}H_{30}O_3$ ($[M+H]^+$ calculé 379.2273 pour $C_{25}H_{31}O_3$).

Données de Résonance Magnétique Nucléaire

Le spectre RMN du ^{13}C enregistré en J-modulé (^{13}C -JMOD-RMN) indique la présence de 25 atomes de carbones dont 9 carbones quaternaires, 7 groupements CH, 4 méthylènes (CH_2) et 5 fonctions méthyle (CH_3).

L'ensemble des données obtenues par IR, RMN, et par MS nous ont permis de déterminer la présence d'une fonction γ lactone β insaturée, ainsi que d'une fonction éther d'énol. Ces données permettent de proposer pour la molécule M6 une formule brute de $C_{25}H_{30}O_3$ et donc un degré d'insaturation de 11. Ces données nous permettent d'émettre l'hypothèse que cette molécule est un isomère de la molécule précédente M-5.

a) Résonance magnétique du proton et du carbone

Le tableau 33 suivant présente les données de ^{13}C -JMOD-RMN et ses corrélations avec le spectre ^1H -RMN obtenues à l'aide du spectre HSQC.

Atome	δ Carbone (ppm)	δ Proton (ppm) (multiplicité, intégration, constante de couplage en Hz)	Type C
1	27,1	1,52 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
2 b a	15,1	0,02 (<i>dt</i> ; 1H ; 2,7 ; 4,0) 0,72 (<i>ddd</i> ; 1H ; 4,0 ; 7,4 ; 8,0)	-CH ₂ -
3	26,7	1,65 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
4	136,2	C _q	C=C
5	129,8	C _q	C=C
6 b a	27,2	1,97 (<i>m</i> ; 1H) 2,89 (<i>d</i> ; 1H ; 14,9)	-CH ₂ -
7	54,4	C _q	-C _q -
8	97,8	C _q	-C _q -O
9	48,5	1,97 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
10	48,6	C _q	-C _q -
11	110,1	C _q	C=C
12	170,5	C _q	C=O
13	150,0	7,40 (<i>s</i> ; 1H)	C=CH
14	24,5	1,26 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
15	13,7	1,76 (<i>d</i> ; 3H ; 1,2)	CH ₃
16 a b	23,5	1,51 (<i>m</i> ; 1H) 2,37 (<i>m</i> ; 1H)	-CH ₂ -
17	121,1	5,57 (<i>de</i> ; 1H ; 7,4)	CH=C
18	139,8	C _q	C=C
19	50,9	2,51 (<i>dd</i> ; 1H ; 6,4 ; 12,1)	-CH-
20 a b	36,5	1,37 (<i>m</i> ; 1H) 2,26 (<i>ddd</i> ; 1H ; 7,9 ; 12,1 ; 13,7)	-CH ₂ -
21	45,2	2,15 (<i>dd</i> ; 1H ; 7,9 ; 10,1)	-CH-
22	79,4	C _q	-C _q -
23	27,7	1,34 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
24	27,7	1,56 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
25	22,5	1,68 (<i>se</i> ; 3H)	CH ₃

Tableau 33.- Attributions des carbones et des protons à l'aide du spectre HSQC

Par similarité avec le spectre de la molécule précédente M5 le spectre ^1H -RMN de la molécule M6 nous a permis de retrouver le groupement méthyle H-14 ainsi que les deux protons blindés H-2a ($\delta_{\text{H}} = 0,72$ ppm) et H-2b ($\delta_{\text{H}} = 0,02$ ppm). De plus, on retrouve les deux protons alcéniques sortant sous la forme d'un singulet à $\delta_{\text{H}} = 7,40$ ppm (H-13) et d'un doublet élargi à $\delta_{\text{H}} = 5,57$ ppm (H-17). H-13 est le plus déblindé de ces deux protons, cela étant sûrement dû à la présence d'un oxygène en position α .

Toutefois, le spectre proton de la molécule M6 montre deux différences significatives par rapport à celui de M5. Tout d'abord on observe la disparition du proton H-5 ($\delta_H = 2,56$ ppm). Deuxièmement, on n'observe plus les protons de l'exométhylène H-15a ($\delta_H = 4,74$ ppm) et H-15b ($\delta_H = 5,18$ ppm), mais on observe l'apparition d'un doublet intégrant pour 3H à $\delta_H = 1,76$ ppm (figure 67).

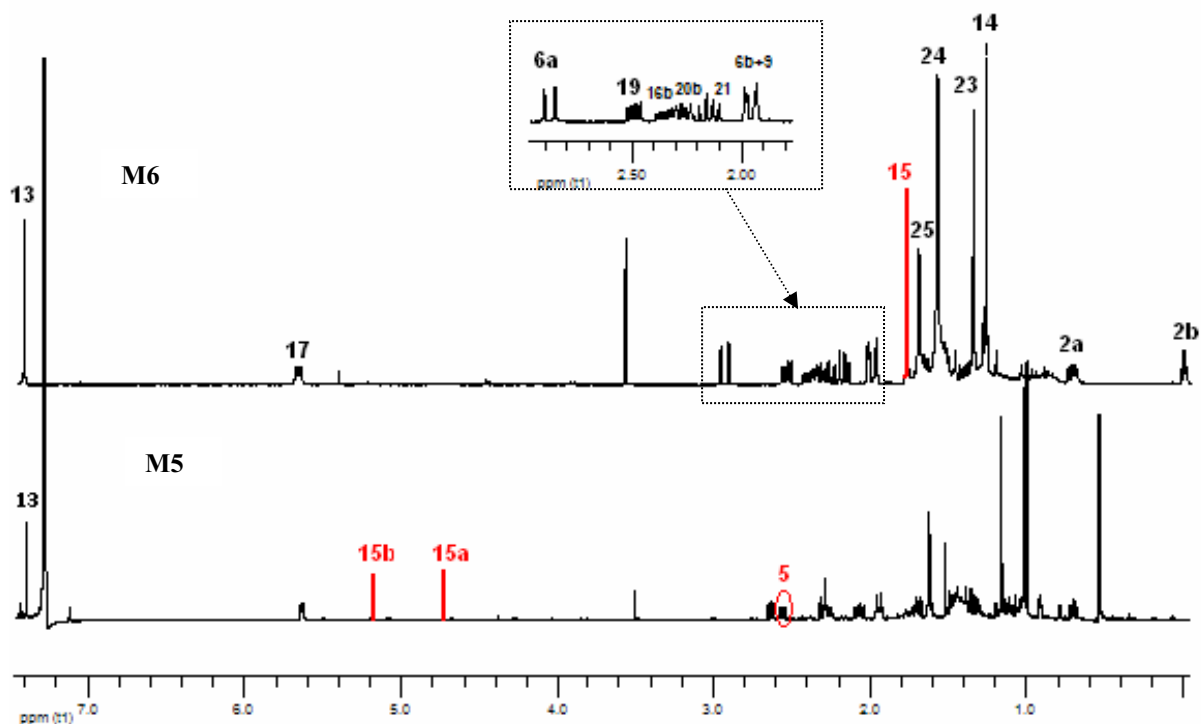


Figure 67.- Spectres RMN 1H comparatifs des composés M5 (C_6D_6) et M6 dans le $CDCl_3$

Sur le spectre ^{13}C -JMOD-RMN (figure 68), nous avons pu identifier par analogie avec le spectre du composé M5, le groupement méthyle C-14 ($\delta_C = 24,5$ ppm), le groupe carbonyle C-12 ($\delta_C = 170,5$ ppm) que confirme la présence de la fonction lactone observée en IR. Nous avons aussi confirmé la présence du cyclopropane grâce aux deux protons fortement blindés H-2a ($\delta_H = 0,72$ ppm) et H-2b ($\delta_H = 0,02$ ppm) portés par le C-2 ($\delta_C = 15,1$ ppm). De plus nous retrouvons le C-13 qui fait partie de la fonction éther d'énol à $\delta_C = 150,0$ ppm.

Toutefois deux différences notables par rapport au spectre de la molécule M5 apparaissent ici aussi. Tout d'abord, on observe que le signal du carbone C-15 ($\delta_C = 105,4$ ppm) et du méthyne C-5 ($\delta_C = 52,1$ ppm) ont disparu. Par contre un méthyle à $\delta_C = 13,7$ ppm et un carbone quaternaire à $\delta_C = 129,8$ sont apparus.

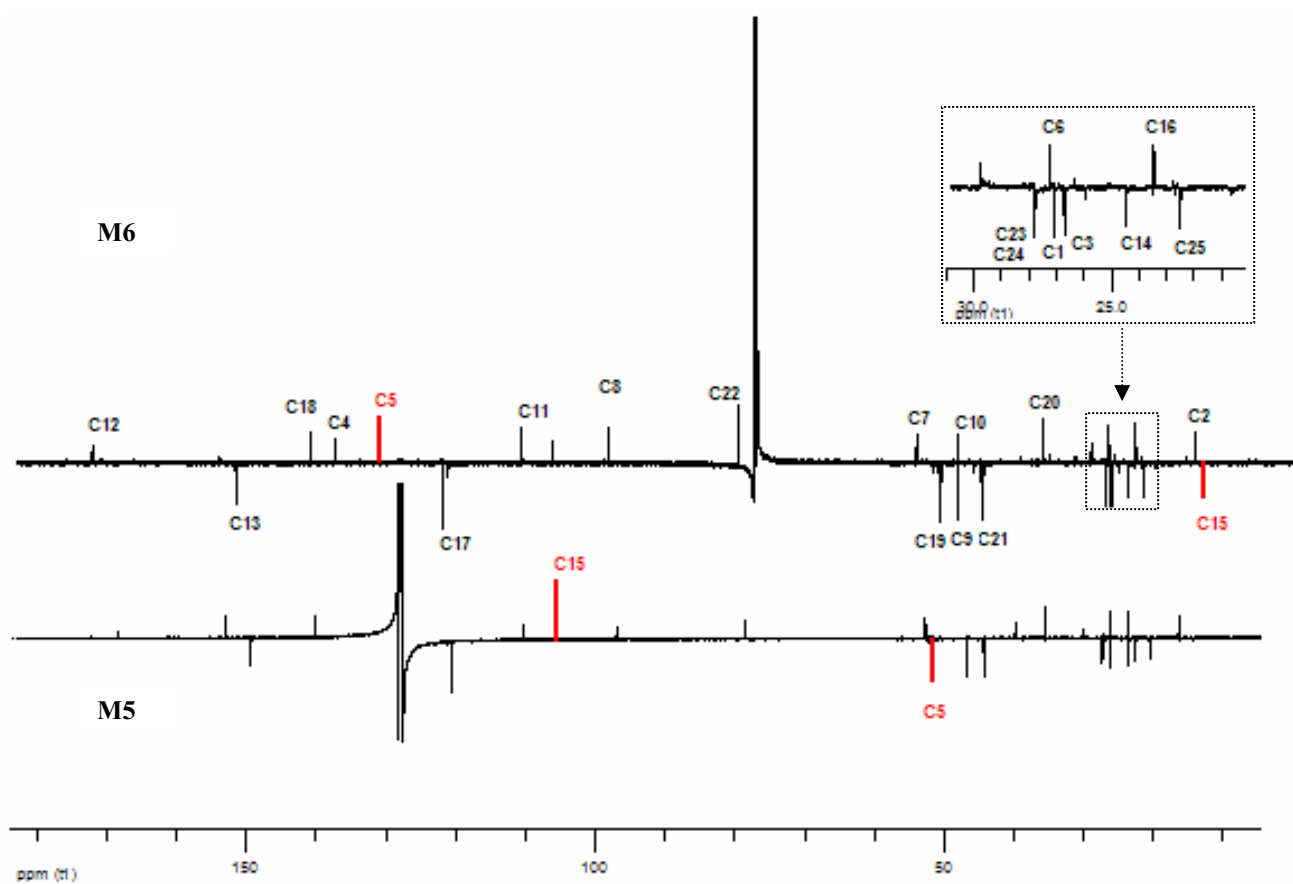


Figure 68.- Spectres RMN ^{-13}C comparatifs entre le composé M5 (C_6D_6) et le composé M2 dans CDCl_3

b) Corrélations COSY

Sur le tableau 34 nous avons résumé les données obtenues grâce au spectre COSY.

Atome	δ Proton (ppm)	Corrélations et constantes de couplage en Hz
1	1,52 <i>m</i>	2a ; 2b ; 3
2 b	0,02 <i>dt</i>	2b-3 = 2,7 2b-1 = 2,7 2b-2a = 4,0
2 a	0,72 <i>ddd</i>	2a-2b = 4,0 2a-3 = 8,0 2a-1 = 7,4
3	1,65 <i>m</i>	1 ; 2a ; 2b
6 b	1,97 <i>m</i>	6a ; 15
6 a	2,89 <i>d</i>	6a-6b = 14,9
9	1,97 <i>m</i>	16a ; 16b
13	7,40 <i>s</i>	
14	1,26 <i>s</i>	
15	1,76 <i>d</i>	15-6b = 1,2
16 a	1,51 <i>m</i>	9 ; 16b ; 17
16 b	2,37 <i>m</i>	9 ; 16a ; 17
17	5,57 <i>de</i>	16a ; 16b ; 25
19	2,51 <i>dd</i>	19-20a = 6,4 19-20b = 12,1
20 a	1,37 <i>m</i>	19 ; 20b ; 21
20 b	2,26 <i>ddd</i>	20b-19 = 12,1 20b-20a = 13,7 20b-21 = 7,9
21	2,15 <i>dd</i>	21-20a = 10,1 21-20b = 7,9
23	1,34 <i>s</i>	24
24	1,56 <i>s</i>	23
25	1,68 <i>se</i>	17

Tableau 34.- Corrélations protons-protons obtenues à l'aide du spectre COSY

Par analogie avec le composé M5, nous confirmons la présence du cyclopropane déjà décrit précédemment grâce aux corrélations entre H-1, H-2a, H-2b et H-3.

c) Corrélations HMBC

Les données sur les corrélations carbones protons provenant du spectre HMBC sont résumées sur le tableau 35.

Atome	δ Carbone (ppm)	HMBC (C→H)
1	27,1	H-14
2	15,1	
3	26,7	H-15
4	136,2	H-6a ; H-6b ou/et H-9 ; H-15
5	129,8	H-3 (f) ; H-6a ; H-6b ou/et H-9 ; H-14 ; H-15
6	27,2	H-14 ; H-21
7	54,4	H-6a ; H-6b ou/et H-9 ; H-13 ; H-21
8	97,8	H-6a ; H-6b ou/et H-9 ; H-19 ; H-20b
9	48,5	H-14 ; H-16b ; H-17 (f) ; H-19
10	48,6	H-6a ; H-6b ou/et H-9 ; H-15 (f)
11	110,1	H-6b ou/et H-9 ; H-13 ; H-21
12	170,5	H-13
13	150,0	
14	24,5	H-6b ou/et H-9 (f) ; H-15
15	13,7	
16	23,5	H-6b ou/et H-9 ; H-17
17	121,1	H-19 ; H-25
18	139,8	H-19 ; H-20a (f) ; H-20b (f) ; H-25
19	50,1	H-17 ; H-20a (f) ; H-20b H-25
20	36,5	H-19 ; H-21
21	45,2	H-6a ; H-6b ou/et H-9 ; H-20a (f) ; H-20b ; H-23 ; H-24
22	79,4	H-13 ; H-20b ; H-23 ; H-24
23	27,7	H-24
24	27,7	H-23
25	22,5	H-17 ; H-19

Tableau 35.- Corrélations carbones-protons obtenus sur le spectre HMBC

d) Attributions des signaux et construction de la molécule

L'attribution des signaux est réalisée par similarités avec le composé précédent M5 à l'aide des données obtenues sur les spectres HMBC (tableau 35) et COSY (tableau 34). En effet, sur le spectre COSY nous retrouvons les corrélations entre les protons du cyclopropane c'est-à-dire H1, H2a, H-2b et H-3 (cycle A, figure 69a). De plus sur le spectre HMBC nous identifions la corrélation entre le carbone C-3 et les protons du groupement méthyle H-15, ceci nous permet d'attribuer le C-15. On retrouve aussi le C-4 grâce aux corrélations en HMBC entre les protons H-15 et le carbone C-4 ($\delta_C = 136,2$ ppm). De plus les protons du groupe méthyle H-15 corrélerent avec le C-5 (cycle B, figure 69a).

Sur le spectre HMBC, on retrouve les corrélations entre C-5 et H-6a et H-6b permettant l'attribution de C-6, attribution confirmée par la corrélation de C-4 avec les deux protons H-6 (cycle C, figure 69b). De la même manière, sur le spectre HMBC nous avons pu retrouver les corrélations décrites pour les molécules précédentes au niveau du cycle C. En effet, nous avons retrouvé les corrélations nous permettant attribuer le C-9, C-10 et C-14 (cycle C, figure 69b).

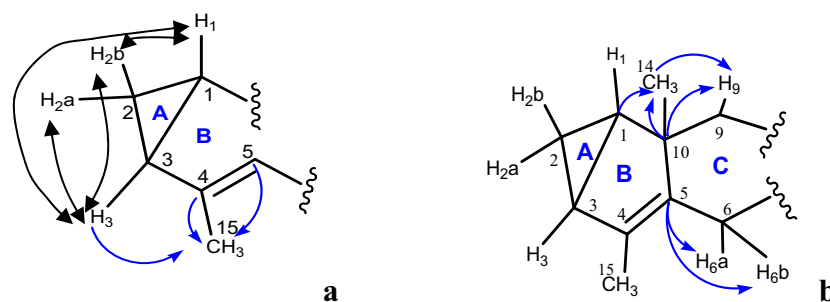
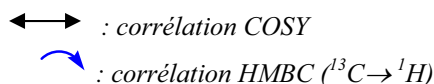


Figure 69.- Corrélations HMBC et COSY



De la même manière nous retrouvons sur le spectre HMBC la corrélation de H-6a et H-6b avec le carbone C-7. De plus ce carbone corrèle en HMBC avec H-21 qui à son tour va corrélérer en COSY avec H-20a et H-20b. De même sur le spectre COSY les deux protons H-20 corrèlent avec le proton H-19. L'ensemble de ces données nous ont permis identifier les carbones C-21, C-20 et C-19. Ces attributions sont confirmées par le spectre HMBC comme sur le composé M5. L'attribution de C-8 est confirmée par la corrélation en HMBC avec H-9, H-19, H-6a et H-20b (cycle F, figure 70).

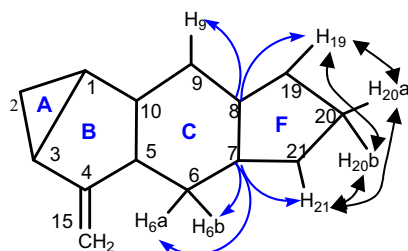


Figure 70.- Corrélations HMBC et COSY



Sur le spectre COSY on retrouve la corrélation entre H-9 et les protons H-16 permettant l'attribution C-16. Ce carbone C-16 comme précédemment corréle aussi avec les protons H-17 et H-9 permettant d'attribuer C-17. Ceci est confirmé sur le spectre COSY par les corrélations entre H-17 avec H-16b, H-16a et H-25. Ceci nous a permis d'attribuer la fonction méthyle C-25. Quant au carbone quaternaire C-18, il corréle sur le spectre HMBC avec H-19, H-25 et aussi avec les protons H-20 (cycle E, figure 71).

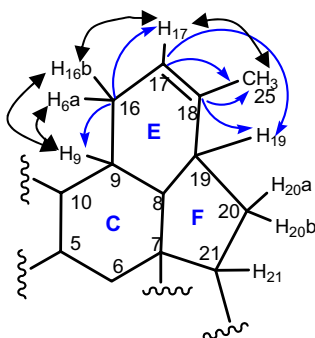
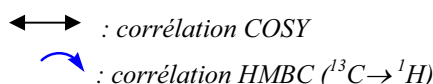


Figure 71.- Corrélations HMBC et COSY



De même le C-21 corréle avec les protons des fonctions méthyles H-23 et H-24. Ces deux groupes méthyles en HMBC corrélent entre eux et avec le carbone C-22 (figure 72).

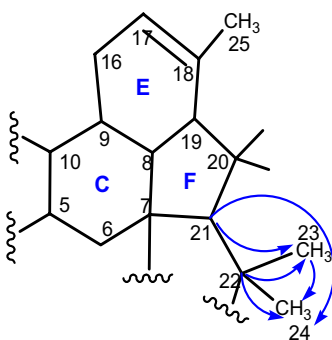
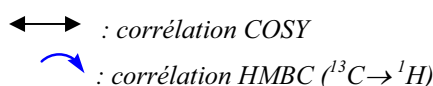


Figure 72.- Corrélations HMBC et COSY



Comme sur le spectre HMBC de la molécule M5, nous observons que le C-7 corréle aussi avec H-21 ainsi qu'avec le proton H-13 ($\delta_{\text{H}} = 7,40$ ppm) permettant de placer la fonction éther d'énol. Cette attribution est aussi confirmée par la corrélation entre H-13 et C-22. Quant

au C-11, il a été retrouvé grâce aux corrélations entre C-11 et H-13, H-6b et H-21. Le carbonyle C-12 corrèle avec H-13 permettant de placer la fonction lactone (cycle G, figure 73).

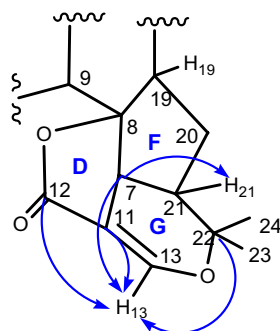
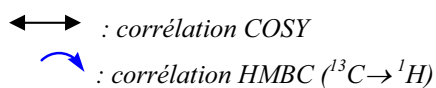


Figure 73.- Corrélations HMBC et COSY



Nous avons donc déterminé la structure de M6, qui est un sesterpène polycyclique isomère de la molécule précédente M5 que nous avons nommé Isobolivianine (figure 74).

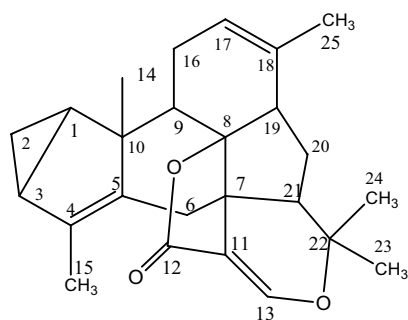


Figure 74.- Structure complète de la molécule M6 : Isobolivianine

e) Corrélations NOESY

Les données de NOESY sont résumées dans le tableau 36.

Atome	δ Proton (ppm)	NOESY (H→H)
1 ou 16a	1,52	H-2a ; H-3 ; H-16b ; H-21
2 b	0,02	H-2a ; H-14
2 a	0,72	H-1 ou H-16a ; H-2b ; H-3
3	1,65	H-1 ou H-16a ; H-2a ; H-15
6b ou 9	1,97	H-6a ; H-14 ; H-16b
6 a	2,89	H-6b ou H-9 ; H-15 ; H-21 ; H-23
9 ou 6b	1,97	H-6a ; H-14 ; H-16b
13	7,40	H-23 ; H-24
14	1,26	H-6b ou H-9 ; H-2b
15	1,76	H-3 ; H-6a ; H-23
16a ou 1	1,51	H-2a ; H-3 ; H-16b ; H-21
16 b	2,37	H-1 ou H-16a ; H-6b ou 9b ; H-17
17	5,57	H-16b ; H-25
19	2,51	H-20b ; H-25
20 a	1,37	H-20b ; H-21
20 b	2,26	H-19 ; H-20a ; H-24
21	2,15	H-1 ou H-16a ; H-6a ; H-20a ; H-23 ; H-24
24	1,34	H-13 ; H-20b ; H-21 ; H-23
23	1,56	H-6a ; H-13 ; H-15 ; H-21 ; H-24
25	1,68	H-17 ; H-19

Tableau 36.- Corrélations obtenues sur le spectre NOESY

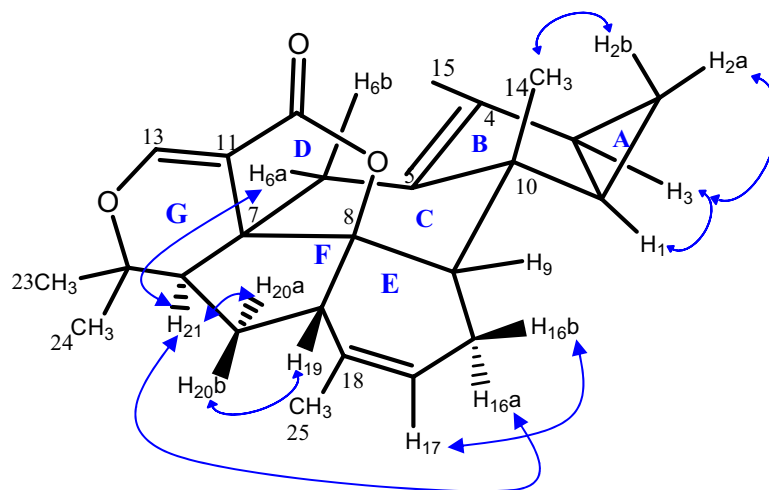


Figure 75.- Corrélations spectre NOESY

L'analyse du spectre NOESY (tableau 36 et figure 75) et des constantes de couplages (tableau 34) nous a permis d'établir la configuration relative de la molécule M6.

Nous observons que cette molécule possède des corrélations NOESY similaires à celles précédemment décrites pour le composé **M5**. En effet, les protons H1, H2a, H3 sont en *anti* par rapport au groupement méthyle C-14. Nous pouvons dire que la stéréochimie des cycles A et B n'est donc pas modifiée. Il faut remarquer que la perte du proton H-5 et la superposition des signaux de H6a et H9 rendent la détermination de la stéréochimie du cycle C plus difficile.

Le proton H-16a corrèle avec H-21, ce qui n'est possible que si les liaisons entre C-9 et C-16 ainsi que entre C-7 et C-21 sont en position *anti* par rapport au méthyle C-14 du cycle C. Par conséquent, la liaison C-8 - C-19 est équatoriale du fait de la jonction des cycles C et E. Ce qui confirme que la liaison C8-O est axiale et la liaison entre C-7 et C-11 est équatoriale, en *syn* par rapport à la fonction méthyle C-14. Ceci nous permet d'affirmer que la stéréochimie relative du cycle C, G et D est donc la même que précédemment.

Les corrélations NOESY entre les protons H-19 et H-20b ainsi qu'entre H-21 et H-20a sont les mêmes que pour la molécule précédente **M5** (cycle E). Ces données nous font conclure que la stéréochimie relative de ces deux molécules (**M5** et **M6**) est identique.

L'analyse des spectres HSQC, HMBC COSY et NOESY nous ont permis d'identifier et d'élucider la structure de **M6**. Donc nous pouvons dire que la molécule **M6** est un isomère structural de la bolivianine (**M5**). Les données qui nous ont permis de différencier ces deux molécules sont la perte d'un hydrogène en position 5 (H-5) due à la présence d'une double liaison entre le C-4 ($\delta_C = 136,2$ ppm) et le C-5 ($\delta_C = 129,8$ ppm) ainsi que l'attribution d'un nouveau méthyle en position 15 (C-15) dû au changement d'hybridation du carbone C-15 sp^2 en sp^3 (figure 76).

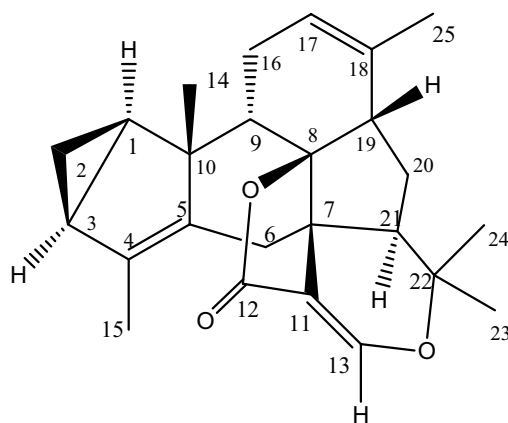


Figure 76.- Structure de **M6**, isolobivianine

3.7.- Détermination structurale du composé M7 : Spathuléol

Le composé **M7** se présente sous la forme d'une huile jaune pâle. Il se révèle sous l'effet de la vanilline sulfurique montrant une couleur violette foncée. Ce composé ne se révèle pas sous la lampe U.V.

Spectroscopie infra-rouge

Le spectre infrarouge présente des bandes à 3400 cm^{-1} et à 3070 cm^{-1} , indiquant la présence de, respectivement : un groupement hydroxyle et un cyclopropane.

Données de spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse réalisé en Electrospray (ESI) en mode négatif, nous observons un ion quasi-moléculaire à $m/z = 219$ $[M-H]^-$ suggérant une masse atomique de 220 uma.

Données de Résonance Magnétique Nucléaire

Le spectre RMN du ^{13}C enregistré en J-modulé (^{13}C -JMOD-RMN) indique la présence de 15 atomes de carbones dont 3 carbones quaternaires, 4 groupements CH, 5 méthylènes (CH_2) et 3 fonctions méthyle (CH_3).

L'ensemble des données obtenues par IR, RMN et par MS nous ont permis de déterminer la présence d'un hydroxyle et d'un groupement cyclopropane. Ces données permettent de proposer pour la molécule **M7** une formule brute de $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_1$ avec un degré d'insaturation de 4.

a) Résonance magnétique du proton et du carbone

Le tableau 37 suivant présente les données de ^{13}C -JMOD-RMN et ses corrélations avec le spectre ^1H -RMN obtenus à l'aide du spectre HSQC.

Atome	δ Carbone (ppm)	δ Proton (ppm) (multiplicité, intégration, constante de couplage en Hz)	Type C
1	53,4	2,23 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
2 a	26,8	1,67 (<i>m</i> ; 1H)	-CH ₂ -
b		1,93 (<i>m</i> ; 1H)	
3 a	41,8	1,58 (<i>ddd</i> ; 1H ; 2,2 ; 4,4 ; 6,2)	-CH ₂ -
b		1,80 (<i>m</i> ; 1H)	
4	81,0	C _q	-C _q -O
5	54,4	1,35 (<i>dd</i> ; 1H ; 1,1 ; 11,3)	-CH-
6	29,9	0,49 (<i>dd</i> ; 1H ; 9,6 ; 11,3)	-CH-
7	27,5	0,74 (<i>m</i> ; 1H)	-CH-
8 a	24,8	1,02 (<i>m</i> ; 1H)	-CH ₂ -
b		2,02 (<i>m</i> ; 1H)	
9 a	38,9	2,08 (<i>m</i> ; 1H)	-CH ₂ -
b		2,45 (<i>dd</i> ; 1H ; 6,0 ; 13,2)	
10	153,5	C _q	C=C
11	20,3	C _q	-C _q -
12	28,7	1,08 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
13	16,4	1,07 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
14	26,1	1,31 (<i>s</i> ; 3H)	CH ₃
15 a	106,3	4,69 (<i>se</i> ; 1H)	C=CH ₂
b		4,72 (<i>se</i> ; 1H)	

Tableau 37.- Attributions des carbones et des protons à l'aide du spectre HSQC

Sur le spectre ^1H -RMN du composé M7 nous pouvons observer trois singulets, à $\delta_{\text{H}} = 1,08$ ppm, à $\delta_{\text{H}} = 1,07$ ppm et à $\delta_{\text{H}} = 1,31$ ppm, chacun intégrant pour 3H. Ces signaux correspondant aux protons de trois groupements méthyles. Deux signaux blindés sont également remarquables : deux multiplets intégrant chacun pour 1H à $\delta_{\text{H}} = 0,74$ ppm et à $\delta_{\text{H}} = 0,49$ ppm. Nous pouvons observer également deux signaux de protons éthyléniques : deux singulets élargis intégrant chacun pour 1H à $\delta_{\text{H}} = 4,69$ (H-15a) et à $\delta_{\text{H}} = 4,72$ ppm (H-15b).

Sur le ^{13}C -JMOD-RMN nous constatons la présence de trois groupements méthyles à $\delta_{\text{C}} = 28,7$ ppm (C-12), à $\delta_{\text{C}} = 16,4$ ppm (C-13) ainsi qu'à $\delta_{\text{C}} = 26,1$ ppm (C-14) ainsi que d'un groupe exo-méthylène à $\delta_{\text{C}} = 106,4$ ppm (C-15). Ensuite nous avons identifié le cyclopropane observé sur le spectre IR grâce à la présence de deux protons blindés ($\delta_{\text{H}} = 0,74$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 0,49$ ppm) portés par deux carbones C-7 et C-6 respectivement. Enfin, nous avons identifié un

carbone quaternaire à $\delta_C = 81,0$ ppm qui vu son déplacement chimique est lié au groupement hydroxyle détecté en IR.

b) Corrélations COSY

Sur le tableau 38 nous avons résumé les données obtenues sur le spectre COSY.

Atome	δ Proton (ppm)	Corrélations et constantes de couplage en Hz
1	2,23 <i>m</i>	2a ; 2b ; 5 ; 15b
2 a	1,67 <i>m</i>	1 ; 2b ; 3a ; 3b
2 b	1,93 <i>m</i>	1 ; 2a ; 3a ; 3b
3 a	1,58 <i>ddd</i>	2a ; 2b ; 3b
3 b	1,80 <i>m</i>	2a ; 2b ; 3a
5	1,35 <i>dd</i>	5-1 = 1,1 5-6 = 11,3
6	0,49 <i>dd</i>	6-5 = 11,3 6-7 = 9,6
7	0,74 <i>m</i>	8b (f) ; 8a ; 6
8 a	1,02 <i>m</i>	7 ; 8b ; 9a
8 b	2,02 <i>m</i>	8a ; 7 (f) ; 9b
9 a	2,08 <i>m</i>	8a ; 9b ; 15a (f)
9 b	2,45 <i>dd</i>	9a ; 8a
12	1,08 <i>s</i>	
13	1,07 <i>s</i>	
14	1,31 <i>s</i>	
15 a	4,69 <i>se</i>	9a (f)
15 b	4,72 <i>se</i>	1

Tableau 38.- Corrélations protons – protons obtenus à l'aide du spectre COSY

c) Corrélations HMBC

Les données sur les corrélations carbone-proton provenant du spectre HMBC sont détaillées dans le tableau 39.

tome	δ Carbone (ppm)	HMBC (C→H)
1	53,4	H-2b ; H-3b ; H-9b ; H-15a ; H-15b
2	26,8	H-1 (f) ; H-3a ; H-3b
3	41,8	H-2b ; H-2a (f) ; H-14
4	81,0	H-3b ; H-14
5	54,4	H-14 ; H-2a (f)
6	29,9	H-5 ; H-8a ; H-12
7	27,5	H-8a ; H-8b ; H-9a ; H-9b ; H-12 ; H-13
8	24,8	H-9a ; H-9b
9	38,9	H-7 ; H-8a ; H-8b ; H-15a ; H-15b
10	153,5	H-9a ; H-9b
11	20,3	H-6 (f) ; H-12 ; H-13
12	28,7	H-6 ; H-13
13	16,4	H-12
14	26,1	
15	106,3	H-9a ; H-9b

Tableau 39.- Corrélations carbonés – protons obtenus sur le spectre HMBC

d) Attributions des signaux et construction de la molécule

L'attribution des signaux est réalisée à l'aide des données obtenues grâce aux spectres HMBC (tableau 39) et COSY (tableau 38). En effet, sur le spectre COSY nous identifions la corrélation entre les protons blindés H-6 et H-7, ce qui nous permet de placer le cyclopropane observé sur le spectre IR. De plus sur le spectre HMBC le proton H-6 corrèle avec le carbone à $\delta_C = 20,3$ ppm. Ces données nous permettent d'attribuer les carbones C-6, C-7 et le C-11. De même nous observons sur le spectre HMBC les corrélations entre le C-11 et les protons des deux groupements méthyles, à $\delta_H = 1,07$ ppm (H-13) et à $\delta_H = 1,08$ ppm (H-12). De plus sur le spectre HMBC ces deux groupes de protons corrélient entre eux et C-12 et C-13 corrélient avec H-7. Ceci permettant de placer les deux groupements méthyles C-13 et C-12 (figure 77a).

De même, sur le spectre COSY on observe que le H-6 corrèle avec le proton $\delta_H = 1,35$ ppm (H-5). De plus sur le spectre HMBC le H-5 corrèle avec C-6, ce qui nous a permis d'attribuer le carbone C-5. Sur le même spectre le C-5 corrèle avec les protons du groupe méthyle H-14 ($\delta_H = 1,31$ ppm). De leur côté ces protons corrélient avec le carbone à $\delta_C = 81,0$ ppm (C-4). Ces données permettent d'attribuer le groupe méthyle C-14 et le carbone C-4 vraisemblablement lié au groupe hydroxyle détecté sur l'IR (figure 77b).

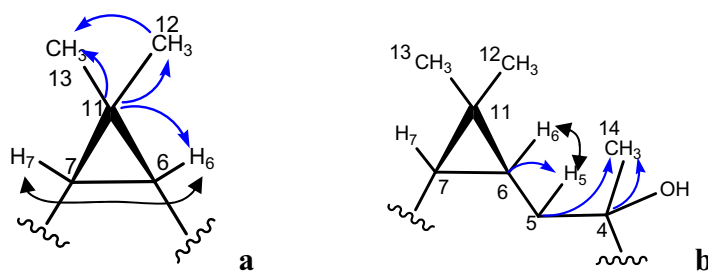


Figure 77.- Corrélations HMBC et COSY

↔ : corrélation COSY
 ↗ : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

Sur le spectre HMBC le carbone C-4 corrèle avec le proton H-3b permettant d'attribuer le C-3. Cette attribution est confirmée par la corrélation entre les protons H-14 et C-3 (figure 78a). De même sur le spectre COSY on observe que les protons H-3a et H-3b corrélient avec les protons H-2a ($\delta_H = 1,77$ ppm) et H-2b ($\delta_H = 1,93$ ppm). De plus les deux protons H-2 corrélient avec H-1 ($\delta_H = 2,23$ ppm) et H-1 corrélie avec H-5. Ceci nous permet de construire un cyclopentane (figure 78b).

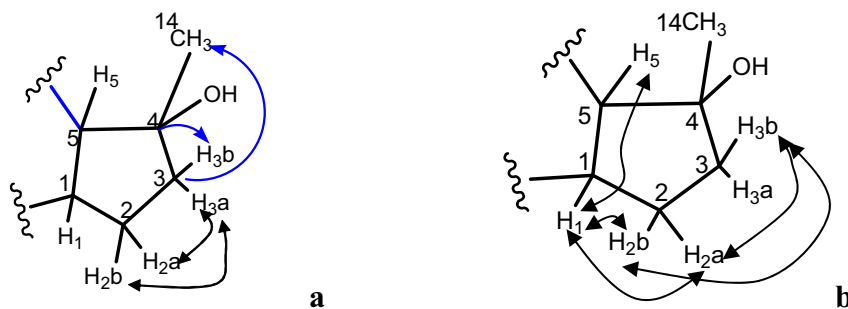


Figure 78.- Corrélations HMBC et COSY

↔ : corrélation COSY

↷ : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

Le spectre HMBC nous a permis d'identifier la corrélation de C-1 avec les protons de l'exométhylène H-15a et H-15b ainsi qu'avec H-9a ($\delta_{\text{H}} = 2,08$ ppm). Sur le même spectre HMBC le carbone C-15 de l'exométhylène corrèle avec les protons H-9a et H-9b ($\delta_{\text{H}} = 2,45$ ppm) (figure 79a). De plus, les protons H-9a et H-9b corrént avec le carbone à $\delta_{\text{C}} = 153,5$ ppm (C-10). Ces données nous permettent d'attribuer les carbones C-15, C-9 et C-10 (figure 79b).

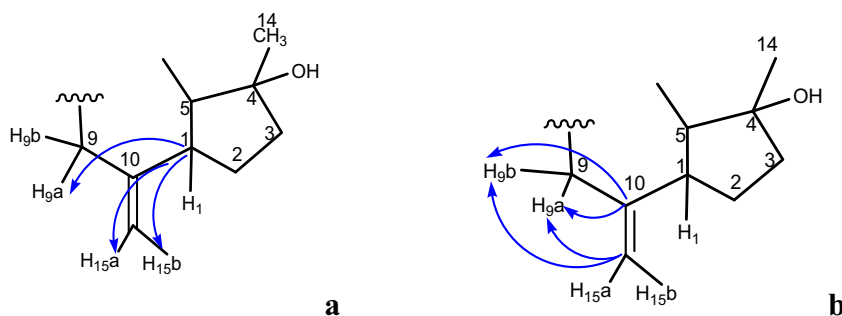


Figure 79.- Corrélations HMBC et COSY

↔ : corrélation COSY

↷ : corrélation HMBC ($^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$)

Sur le spectre HMBC le carbone C-9 corrèle avec les protons H-8a, H-8b, H-7, H-15a et H-15b ce qui permet de placer C-8. Cette attribution a été confirmée par les corrélations entre C-7 et les protons H-8a, H-8b, H-9a, H-9b, H-12 et H-13 (figure 80).

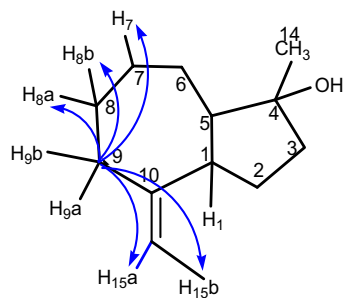
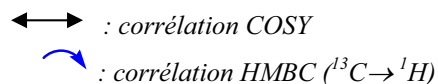


Figure 80.- Corrélations HMBC et COSY



Toutes les données des spectres HSQC, HMBC et COSY nous ont donc permis d'identifier la structure de **M7** comme étant un alcool sesquiterpénique très commun, le spathuléol (figure 81). En effet, les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec les données publiées pour ce composé [Inagaki et Abe, 1985; Krebs *et al.*, 1990].

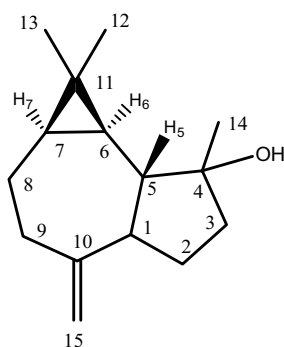


Figure 81.- Structure de M7 : Spathuléol

3.8.- Discussion : molécules isolées

Au long de ce travail de thèse, à partir des écorces de l'espèce végétale *Hedyosmum angustifolium*, nous avons isolé et identifié 7 molécules dont quatre sont nouvelles, **M2**, **M4**, **M5** et **M6** et présentent des structures originales caractérisées, pour la plupart, par la présence d'un groupe cyclopropane ainsi que par une lactone à cinq atomes.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les lactones sesquiterpéniques de type lindénane sont des métabolites secondaires caractéristiques de la famille des Chloranthaceae [Kawabata et Mizutani, 1988]. Malheureusement les recherches effectuées sur ces molécules n'ont pas pu apporter d'information solide sur les mécanismes de formation biogénétique de cette famille de composés.

En effet, il existe une étude, sur l'espèce *Chloranthus japonicus*, qui propose un mécanisme de biosynthèse pour les lactones sesquiterpéniques de type lindénane. Cette étude met en avant la présence de plusieurs lindénanes ainsi que des germacrane tel que l'isofuranodiène au sein de la plante [Kawabata *et al.*, 1985]. Les furanogermacrane sont considérés comme les intermédiaires clés dans la biosynthèse des autres furanosesquiterpènes. Egalement, le glechomanolide peut être le précurseur de plusieurs lactones sesquiterpéniques tels que le shizukanolide et dérivés. Cette voie de biogenèse hypothétique est détaillée dans le schéma 10 [Kawabata *et al.*, 1981].

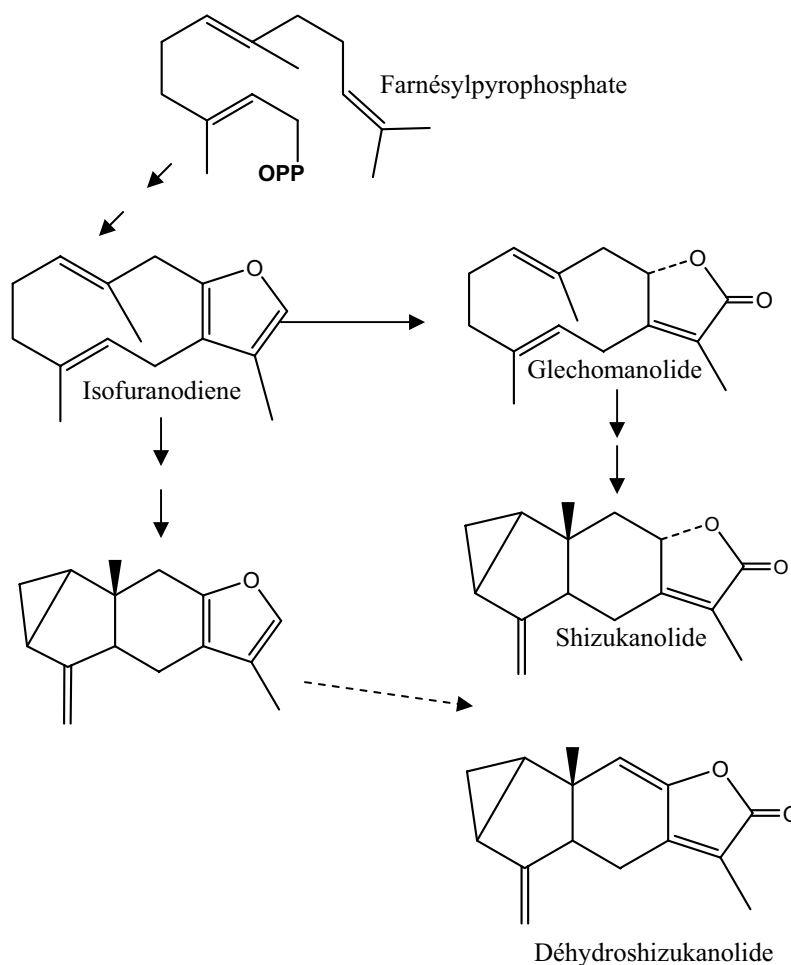


Schéma 10.- Mécanisme possible de formation biogénétique de sesquiterpènes de type lindénane

Parmi les composés isolés, nous avons identifié l'onosériolide (structure 32), **M1**, qui est une lactone sesquiterpénique de type lindénane déjà décrite dans deux autres espèces végétales : *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae) [Trentin *et al.*, 1999] et *Onoseris albicans* (Asteraceae) [Bohlmann *et al.*, 1980]. Comme nous l'avons mentionné, cette molécule, présente une activité anti-nociceptive très intéressante. De plus, on peut supposer que la molécule nouvelle **M2**, l'oxyonosériolide (structure 33), est issue d'un processus d'oxydation de la double liaison entre le C8 et C9 de l'onosériolide au sein de la plante.

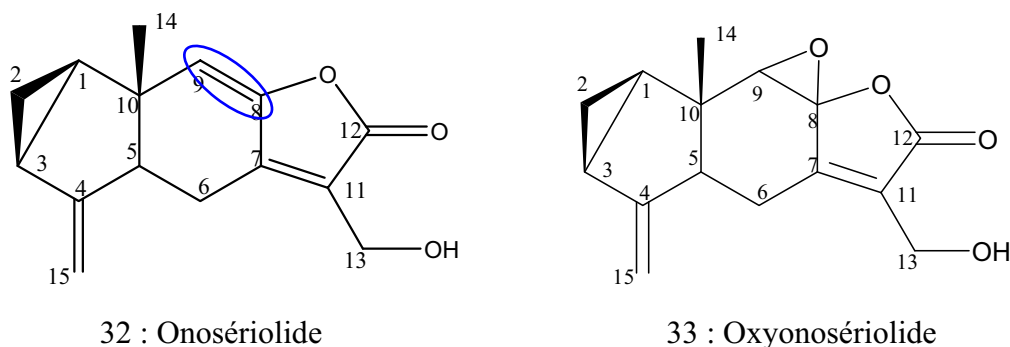


Figure 82.- Structures de l'onosériolide et de l'oxyonosériolide

De même nous avons isolé une autre lactone sesquiterpénique de type lindénane, la chloranthalactone A (**M3**), connue aussi sous le nom de déhydro-shizukanolide, cette molécule a été déjà isolée de trois espèces de Chloranthaceae [Kawabata *et al.*, 1981; Takeda *et al.*, 1993; Tsui et Brown, 1996].

Nous avons isolé l'hédyosmone, composé **M4**. Cette molécule est pour la première fois isolée et identifiée d'une source naturelle. Elle a été caractérisée pour la première fois comme une molécule de synthèse, provenant de l'hydrolyse alcaline du shizukanolide 1, suivie d'une méthylation au diazométhane (schéma 11) [Kawabata *et al.*, 1981].

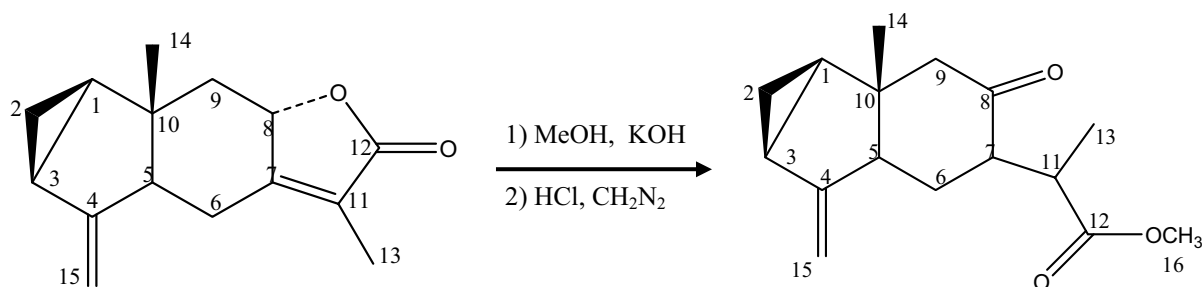


Schéma 11.- Réaction alcaline du shizukanolide

Nous n'avons pas isolé le shizukanolide, mais la présence de la chloranthalactone A au sein de la plante nous amène à penser que le shizukanolide est également présent dans *H. angustifolium*. Ces données, donc, nous ont permis d'émettre l'hypothèse que le composé **M4** est le produit d'hydrolyse du shizukanolide.

Enfin, les molécules isolées les plus originales sont la bolivianine (**M5**) (structure 34) et l'isobolivianine (**M6**) (structure 35), ces deux composés sont des isomères structuraux (figure 83).

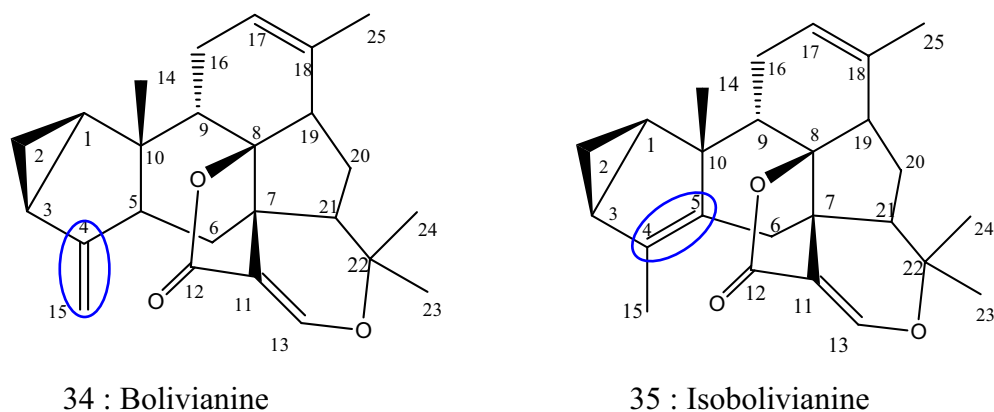


Figure 83.- Structures de la bolivianine et de l'isobolivianine

Ces deux produits peuvent être tout deux présents dans la plante, ou bien un de ces produits peut être issu de l'isomérisation de l'autre lors de processus de purification.

Tout d'abord, le fractionnement d'un premier lot de plante nous a permis d'obtenir une fraction. Dans une première étape nous avons effectué un spectre ^1H -RMN de cette fraction dans du chloroforme deutéré, puis le solvant a été évaporé et le résidu a ensuite été stocké à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant plusieurs semaines. Après, nous l'avons reprise dans du CDCl_3 puis analysée par RMN (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY et NOESY). Cette fraction a été identifiée en tant que isobolivianine **M6** presque pure (80 %). Un deuxième lot a été fractionné, en essayant de purifier dans les mêmes conditions l'isobolivianine pour avoir plus d'information sur les données RMN. Une molécule avec le même profil CCM que la précédente a été isolée. Son analyse RMN a été conduite dans du benzène deutéré, afin d'éviter le chevauchement de certains signaux au niveau du spectre proton. De façon surprenante, nous avons déterminé la structure de la bolivianine **M5**.

A cette étape nous avons émis l'hypothèse que la bolivianine (**M5**) est un produit naturel et que l'isobolivianine (**M6**) est le produit d'isomérisation du produit naturel. Cette hypothèse a été prouvée au cours du travail de thèse comme nous allons le détailler.

Hypothèse d'isomérisation

En effet, le premier spectre ^1H -RMN réalisé au cours du premier fractionnement était bien celui de la bolivianine (**M5**), qui s'est isomérisée durant le stockage. En effet, la seule différence remarquable au niveau du processus d'isolement entre ces deux molécules était que

la première a été solubilisée dans le CDCl_3 , qui a été évaporé, avant le stockage de la molécule. Ce qui nous amène à supposer que les traces d'acide chlorhydrique dans le CDCl_3 ont généré un milieu acide qui joue le rôle de catalyseur. En effet, l'isomérisation en milieu acide de la molécule est possible pour conduire à l'alcène le plus substitué. La double liaison est tout d'abord protonée au niveau du carbone 15, créant un déficit électronique au niveau du carbone 4, qui est tout de suite compensé par la perte du proton 5 et par la formation d'une double liaison entre le carbone 4 et 5 plus stable que le méthylène 15 (schéma 12).

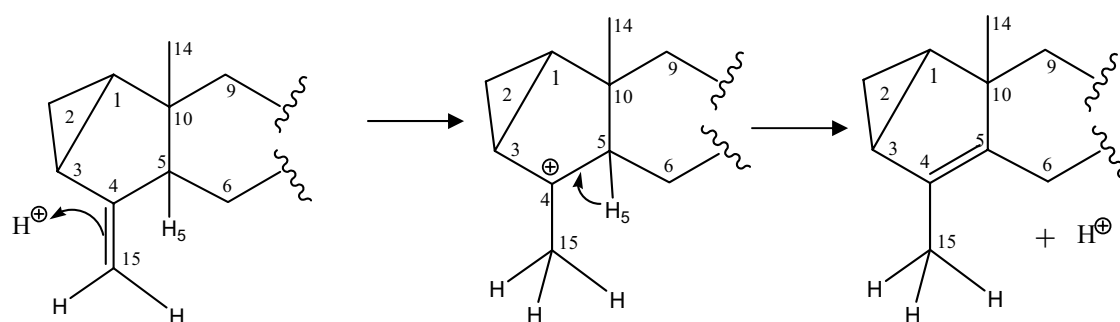


Schéma 12.- Hypothèse d'isomérisation en milieu acide de la bolivianine

Cette hypothèse a été confirmée au laboratoire, 2 mg de bolivianine ont été solubilisés dans du chloroforme deutéré (Aldrich), puis le solvant a été évaporé pendant 9 heures sous pression réduite et à 40 °C. Le chauffage est nécessaire à l'isomérisation. On remarque sur le spectre ^1H une apparition des signaux caractéristiques de l'isobolivianine comme par exemple le proton H-2b ($\delta_{\text{H}} = 0,02$ ppm) qui sort très blindé par rapport à celui de la bolivianine ($\delta_{\text{H}} = 0,91$ ppm), ainsi qu'une disparition des signaux des protons H15 et H5 de la bolivianine. Grâce aux données de ^1H -RMN nous avons observé que l'isomérisation n'était pas complète. Sur la figure 84 on peut observer la superposition des signaux des deux molécules et la diminution en intensité des signaux de H-15a, H-15b et H-5.

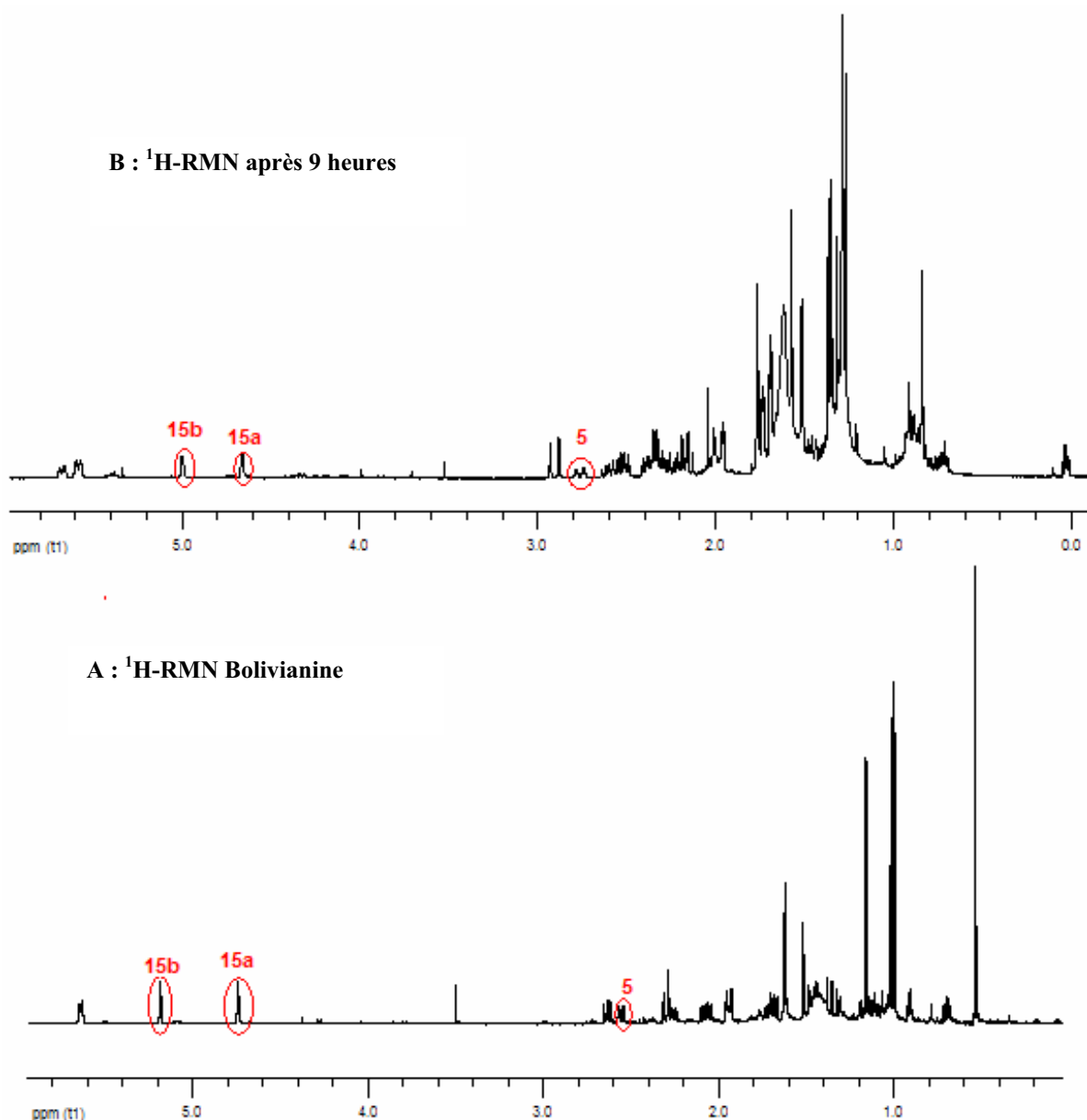


Figure 84.- Comparaison des ^1H -RMN au cours du processus d'isomérisation, A : bolivianine et B : après 9 heures à 40°C

Une isomérisation complète est obtenue après 72h à 40°C, sous pression atmosphérique. Kawabata *et al.*, ont décrit l'isomérisation du shizukanolide en milieu acide [Kawabata *et al.*, 1981]

Grâce à ces résultats, nous avons bien mis en évidence que la bolivianine (**M5**) est un produit naturel issu d'écorces d'*Hedyosmum angustifolium* et que l'isobolivianine est un isomère structural de la bolivianine, issu de la migration de la double liaison.

Hypothèse de biogenèse de la bolivianine

Nous avons essayé d'expliquer la présence de ces molécules dans la nature et nous avons voulu mettre en place une hypothèse de biogenèse à partir de la condensation d'une lactone sesquiterpénique de type lindenane et d'un groupement géranyle. Ce que nous pouvons observer sur la figure 85.

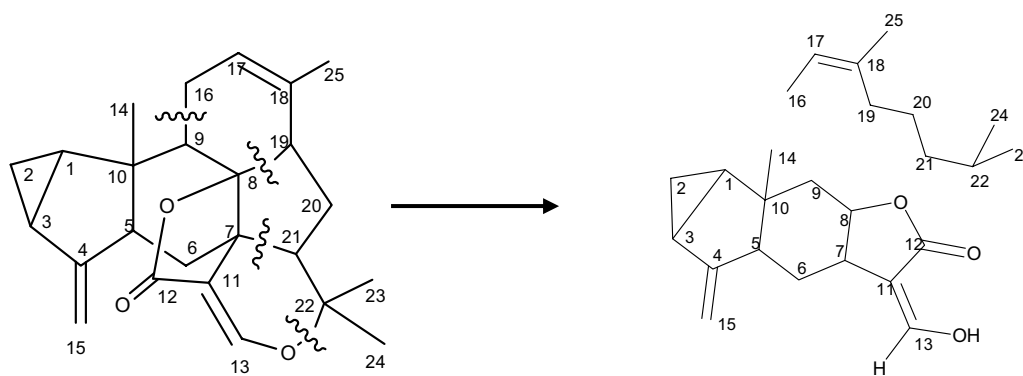


Figure 85.- Hypothèse de la biogenèse de la bolivianine

Nous allons détailler un mécanisme possible de biogenèse du sesterpène à partir de l'onosériolide (**M1**) (schéma 13). L'oxydation de l'alcool allylique en position 13, donne une fonction aldéhyde. L'hydrolyse en position 12 va permettre l'attaque nucléophile de l'énol, en position 9, sur le géranyle pyrophosphate, sachant que le pyrophosphate est un bon groupement partant.

Après l'isomérisation de la double liaison (C-17-C-18) sur le géranyle pyrophosphate, cette même double liaison attaque le centre nucléophile (position 8) permettant la formation du cycle E suivi par une déshydratation et reformation de la lactone (cycle C). Les cycles G et H sont ensuite formés par une réaction de type Diels-Alder [4+2]

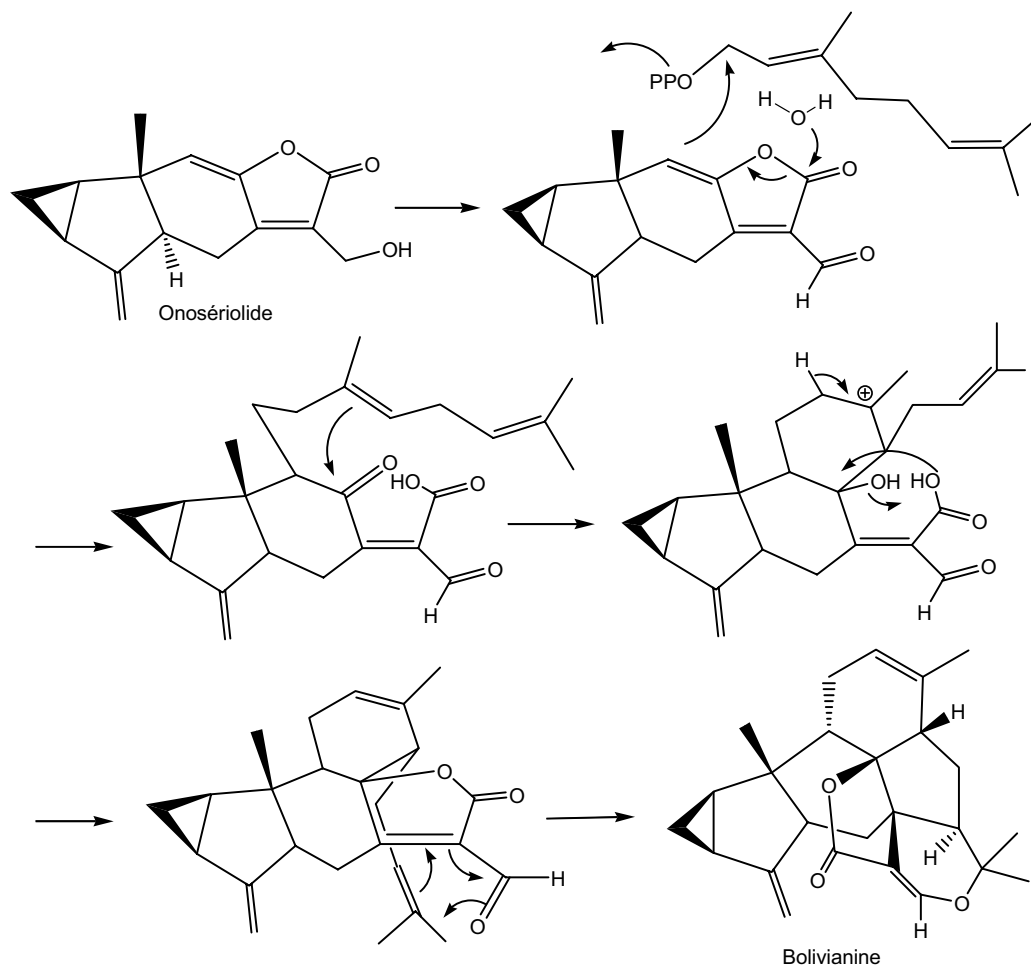


Schéma 13.- Hypothèse de biogenèse de la bolivianine

Cette hypothèse de mécanisme a été motivée par l'identification de l'onosériolide dans la molécule M5. Considérant cela nous avons ensuite appliqué un mécanisme de formation habituel pour les terpènes : la condensation d'un groupement génylyle, sur l'onosériolide que l'ont sait présent dans la plante. Toutefois, cette hypothèse n'a pas pu être confirmée par des expériences de synthèse ou l'isolement d'un intermédiaire biogénétique dans la plante, mais semble tout à fait vraisemblable.

Enfin, dans la dernière partie de ces résultats nous allons aborder l'étude des activités biologiques de chacune des molécules isolées durant ce travail.

4.- Résultats des test biologiques *in vitro*

L'ensemble des tests biologiques a été effectué à la plateforme de biologie de l'UMR-152 : la mesure de l'activité antiplasmodiale et cytotoxique a été effectuée en collaboration avec Séverine Chevalley (Ingénieur de recherche) et Eliane Péliou (Technicienne en biologie).

4.1.- Activités antileishmaniennes

4.1.1.- Amastigotes axéniques

Les évaluations de bioguidage *in vitro* ont été réalisées sur des cultures de promastigotes et d'amastigotes axéniques de *Leishmania amazonensis* (leishmaniose cutanée) (clone 1 MHOM/BR/76/LBT-012).

Les parasites subissent de profonds changements morphologiques, biochimiques et métaboliques lors de la différenciation des promastigotes (chez le vecteur) en amastigotes (chez l'hôte vertébré) [Ouellette *et al.*, 2003; Saar *et al.*, 1998; Sereno et Lemesre, 1997a]. Les promastigotes se trouvent chez l'invertébré dans un milieu neutre et à une température de 25°C, tandis qu'à l'intérieur du phagolysosome du macrophage, le parasite vit à 37°C et à pH acide. Il a été démontré que le modèle des amastigotes axéniques s'approche des conditions biologiques observées à l'intérieur du macrophage. C'est donc le stade amastigote qui a retenu l'essentiel de notre attention [Saar *et al.*, 1998; Sereno et Lemesre, 1997a].

L'activité antileishmanienne des molécules sur les formes amastigotes de *L. amazonensis* a été déterminée à l'aide de la technique colorimétrique du MTT décrite par Sereno et Lemesre, [1997b]. Le test est basé sur la transformation d'un sel de tétrazolium [3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)] (MTT) en formazan par réduction enzymatique. En bref, le cycle tétrazolique qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu-violet. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes

présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique. Les parasites sont maintenus en culture continue selon une méthode décrite par Sereno et Lemesre, [1997a].

Dans le tableau 40 nous présentons les critères d'évaluation et de sélection des extraits les plus actifs en fonction des CI_{50} mesurées. Ces critères ont été utilisés pendant les premières étapes de criblages effectués sur les formes promastigotes de *L. amazonensis* au sein du laboratoire de l'IIFB (La Paz, Bolivie).

CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Activité
<1,0	Très bonne
De 1,0 - 10,0	Bonne
11,0 – 20,0	Modérée
>20,0	Inactif

Tableau 40.- Evaluation de l'activité leishmanicide en fonction de la valeur de la CI_{50}
(extrait de l'IIFB)

Une fois que les molécules ont été isolées et caractérisés nous avons voulu vérifier leurs activités antileishmaniennes sur une espèce de *Leishmania* responsable d'une autre forme de la maladie, la leishmaniose viscérale. Pour cela nous avons utilisé des cultures d'amastigotes axéniques de *Leishmania infantum* (clone1 MHOM/MA/67/ITMAP-236). Les amastigotes de *L. infantum* ont été transfectés avec le gène de la luciférase. La technique d'évaluation de leur activités métaboliques est basée sur le principe de la dégradation du substrat luciférine par la luciférase (exprimée par les parasites) en présence d'ATP. Ce processus de dégradation est accompagné d'une émission de photons. Cette émission des photons est liée directement à la concentration des parasites. Cette technique permet le criblage de plusieurs échantillons, avec une facilité de manipulation et une interprétation rapide des résultats [Sereno *et al.*, 2001]. Ces amastigotes axéniques sont maintenus en culture à 36 ± 1 °C selon les paramètres décrits par Sereno et Lemesre, [1997a].

Les activités des molécules sur les amastigotes de *L. amazonensis* et sur *L. infantum* sont détaillées dans le tableau 41.

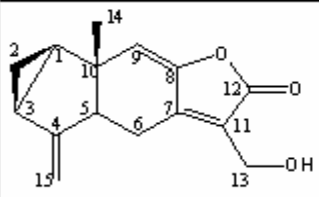
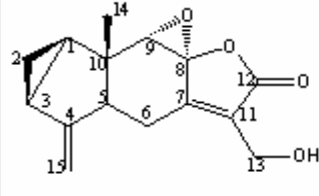
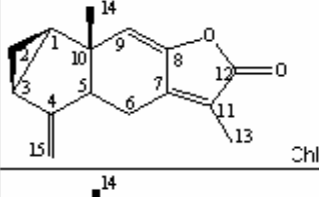
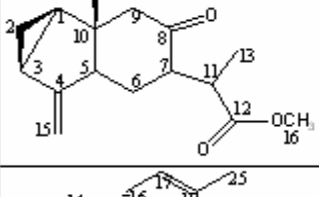
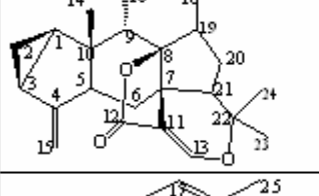
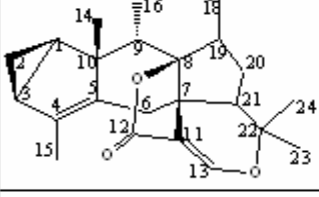
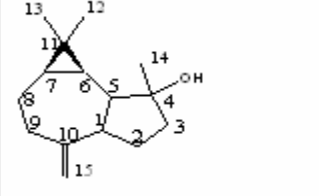
Molécule	Cod	PM (g.M ⁻¹)	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>
			CI ₅₀ (µM)	CI ₅₀ (µM)
 Onosériolide	M1	244	19,8±3,7	20,9±2,7
 Oxyonosériolide	M2	260	57,7±5,0	90,4±3,7
 Chloranthalactone A	M3	228	>50	176,5±17,0
 Hedyosmone	M4	262	>50	235,5±12,3
 Bolivianine	M5	378	NT	NT
 Isobolivianine	M6	378	102,3±1,9	NT
 Spathuléol	M7	220	79,8±1,9	83,3±4,6
Extrait brut	EB (µg.mL ⁻¹)	16		
Extrait acétate d'éthyle	EAE (µg.mL ⁻¹)	17		
Fraction 2 de l'extrait acétate d'éthyle	F2 (µg.mL ⁻¹)	<10		
Fraction 3 de l'extrait acétate d'éthyle	F3 (µg.mL ⁻¹)	<10		
Alcaloïdes totaux de <i>Galipea longiflora</i>	(µg.mL⁻¹)	23,3±1,54		
Amphotericine B : <i>L. amazonensis</i>	µM	0,23±0,06		
Pentamidine : <i>L. infantum</i>	µM	1,7±0,26		

Tableau 41.- Résumé des activités antileishmaniennes sur les amastigotes axéniques (écart-type calculé sur trois expériences)

Comme nous pouvons l'observer, l'activité antileishmanienne initiale se concentre dans les fractions F2 et F3 de l'extrait acétate d'éthyle avec des CI_{50} inférieurs à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A partir de la fraction F3, nous avons isolé deux molécules : l'onosérioride (**M1**) et oxyonosérioride (**M2**). De plus, le composé **M1**, se montre le plus actif tant sur les amastigotes de *L. amazonensis* que sur ceux de *L. infantum* avec des CI_{50} de $19,8 \mu\text{M}$ et $20,9 \mu\text{M}$ respectivement. Suivi par la molécule **M2** avec des CI_{50} de $57,7$ et de $90,4 \mu\text{M}$ sur *L. amazonensis* et sur *L. infantum*.

De la fraction F2, nous avons obtenu cinq molécules supplémentaires (**M3**, **M4**, **M5**, **M6** et **M7**). On observe que ces molécules ne présentent pas d'activité antileishmaniennes significatives contre les amastigotes des deux espèces à l'exception du spathuléol (**M7**) qui montre une activité modérée sur les deux espèces avec des CI_{50} de $79,8 \mu\text{M}$ pour *L. amazonensis* et de $83,3 \mu\text{M}$ pour *L. infantum*.

L'efficacité du bioguidage peut être discutée : si on compare l'activité de l'extrait de départ ($CI_{50} = 16 \mu\text{g.mL}^{-1}$), cette activité a été concentrée sur les fractions F2 et F3 avec des $CI_{50} < 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Dans le cas de l'onosérioride ($CI_{50} = 4,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) elle peut être considéré comme responsable de l'activité de la fraction F3. En effet, une analyse par RMN a montré que cette fraction est composée essentiellement de 80 % d'onosérioride et 20% d'oxyonosérioride. En ce qui concerne les cinq composés isolés de la fraction F2 (CI_{50} comprises entre $17,6$ et $> 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) nous n'avons pas concentré l'activité car les composés ont une activité inférieure à celle de la fraction F2 de départ ($CI_{50} < 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). On peut supposer que cette activité pourrait être due à la synergie de plusieurs molécules ou à des composés minoritaires présents dans la fraction F2 qui n'ont pas encore été isolés.

4.1.2.- Amastigotes intracellulaires

Nous avons quantifié l'activité antileishmanienne sur le modèle du macrophage infecté par *Leishmania infantum*. Classiquement, la mesure de cette activité se fait à l'aide de la coloration au Giemsa [Berman et Lee, 1984] ou dans certains cas par des techniques de quantification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) [Katakura *et al.*, 1998; Noyes *et al.*, 1998]. Nous avons préféré utiliser une technique nouvelle qui implique l'infection des macrophages par des amastigotes de *L. infantum* transfectés par le gène de la luciférase

(utilisée déjà précédemment pour la quantification des amastigotes axéniques) [Lang *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2000; Sereno *et al.*, 2001]. Cette méthode possède de nombreux avantages :

- Lors des mesures de quantification de l'activité, le nombre total de parasites est pris en compte, alors que par la technique de coloration au Giemsa, on extrapole les observations d'un prélèvement à tout l'échantillon.
- Cette expérience permet de tester les produits *in vitro* dans des conditions très proches de celles *in vivo*, ce qui donne donc des renseignements plus précis sur l'activité potentielle de certains composés par rapport aux autres test purement *in vitro*. En effet, lors de ce test, les parasites sont logés dans les macrophages humains à l'intérieur de vacuoles parasitophores. Les molécules testées sont donc amenées à traverser plusieurs barrières avant d'arriver aux parasites. De plus, il est possible que ces molécules soient métabolisées par les macrophages, ce qui permet d'avoir une idée du futur comportement *in vivo* de la molécule testée.
- Il est possible de tester un plus grand nombre de produits qu'avec les méthodes classiques et les résultats sont plus faciles à interpréter.

Les données des activités des molécules sur le modèle intracellulaire sont résumées dans le tableau 42. Nous avons pu observer un effet-dose pour chaque molécule. De plus, nous avons constaté un effet du temps de contact entre les molécules et les parasites pendant la phase d'incubation. En effet nous avons décidé de tester l'effet du temps d'incubation afin d'avoir plus de renseignements sur l'évolution de l'activité des molécules testées au cours du temps.

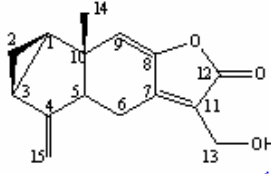
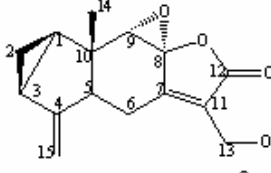
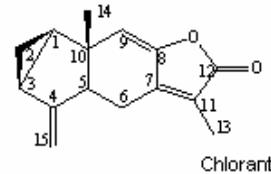
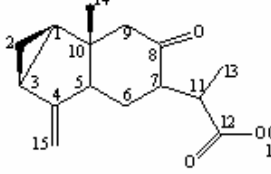
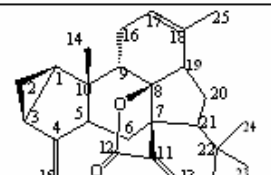

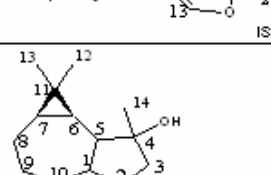
Molécule	Cod	PM (g.M ⁻¹)	CI ₅₀ (µM)	CI ₅₀ (µM)	CI ₅₀ (µM)	CI ₅₀ (µM)
			24 Hrs	48 Hrs	72 Hrs	96 Hrs
 <p>Onosériolide</p>	M1	244	25,4	29,5	24,6	25,0
 <p>Oxyonosériolide</p>	M2	260	54,6	189,6	143,8	140,8
 <p>Chloranthalactone A</p>	M3	228	NT	NT	NT	NT
 <p>Hedyosmone</p>	M4	262	188,2	>100	>100	NT
 <p>Bolivianine</p>	M5	378	NT	NT	NT	NT
 <p>isobolivianine</p>	M6	378	NT	NT	NT	NT
 <p>Spathuléol</p>	M7	220	3,2	23,6	54,5	NT
Pentamidine			0,1	0,6	0,7	0,6
Amphotericine B			<0,1	0,1	0,3	0,4

Tableau 42. – Résultats des activités sur le modèle du macrophage infecté par *L. infantum* transfecté par le gène de la luciférase (une expérience)

Lors de ces expérimentations, nous avons constaté que le spathuléol (**M7**) induit une diminution du nombre de parasites avec une $CI_{50} = 3,2 \mu\text{M}$ au bout de 24 heures d'incubation. De même à 48 heures la CI_{50} est de $23,6 \mu\text{M}$ et à 72 heures elle est de $54,5 \mu\text{M}$. De plus, on peut supposer que l'activité de cette molécule est plus marquée sur les premières étapes d'infection des macrophages. Tous ces résultats sont très encourageants mais restent à vérifier.

De même, l'onosériolide a gardé la même activité sur les parasites infectant le macrophage pendant toute la durée du test (96 heures) avec des CI_{50} comprises entre $24,6$ et $29,5 \mu\text{M}$. Il faut remarquer que les CI_{50} obtenues sur les trois tests de mesure de l'activité antileishmanienne, c'est-à-dire sur les amastigotes axéniques des deux espèces de *Leishmania* et les macrophages infectés, pour cette molécule sont du même ordre de grandeur.

4.2.- Activités cytotoxiques

L'évaluation de la cytotoxicité a été réalisée sur trois souches de cellules : les cellules MCF7 (lignée de cellules tumorales mammaires humaines), les cellules VERO (lignée de cellules de reins de singe) et les cellules THP-1 (lignée de monocytes humains). La méthode utilisée repose sur l'estimation de l'inhibition de la prolifération des cellules par l'incorporation d'hypoxanthine tritiée dans l'ADN. Les activités cytotoxiques de chacune des molécules sont détaillées dans le tableau 43.

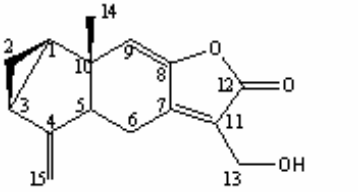
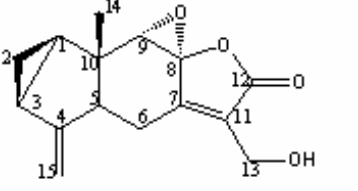
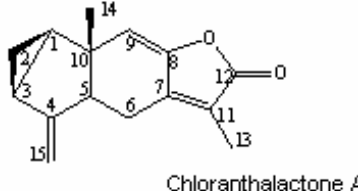
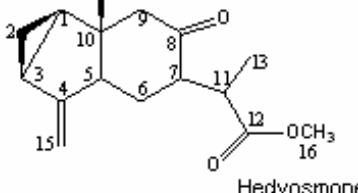
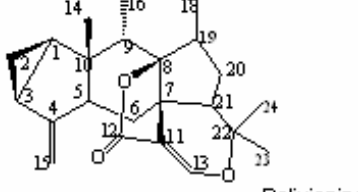

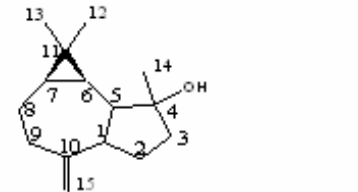
Molécule	Cod	PM (g.M ⁻¹)	MCF-7 IC 50 (µM)	THP-1 IC 50 (µM)	VERO IC50 (µM)
 Onosériolide	M1	244	22,7±1,1	31,9±5,9	28,7
 Oxyonosériolide	M2	260	23,8±1,7	4,2±0,4	0,2
 Chloranthalactone A	M3	228	168,9±0,7	175,4±8,5	114,0
 Hedyosmone	M4	262	181,3±0,7	129,8±2,8	61,1
 Bolivianine	M5	378	37,0	NT	NT
 Isobolivianine	M6	378	108,5±1,4	103,2±26,9	111,1
 Spathuléol	M7	220	134,1±6,4	193,2±13,4	154,5
SDS CI ₅₀	60 µg.mL ⁻¹				

Tableau 43.- Résultats des activités cytotoxiques (écart-type calculé sur deux expériences)

Le tableau 43 montre que la molécule la plus active tant sur la lignée MCF-7, la lignée THP-1 que sur la lignée VERO est l'oxyonosériolide ($CI_{50} = 23,8 \mu\text{M}$, $CI_{50} = 4,2 \mu\text{M}$ et $CI_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ respectivement).

Vient ensuite, le composé **M1**, l'onosériolide qui a des $CI_{50} = 22,7 \mu\text{M}$ sur la lignée MCF-7, $CI_{50} = 31,9 \mu\text{M}$ THP-1 et sur la lignée VERO un $CI_{50} = 28,7 \mu\text{M}$. D'autre part, on observe que les autres molécules (**M3**, **M4**, **M5**, **M6** et **M7**) ne présentent pas d'activité significatives sur les lignées cellulaires testées avec des CI_{50} comprises entre $37,0 \mu\text{M}$ et $193,2 \mu\text{M}$.

L'analyse de la cytotoxicité nous permet aussi de déterminer la sélectivité des différentes molécules grâce au calcul de l'index de sélectivité ($IS = CI_{50}\text{cellule}/CI_{50}\text{parasites}$). Si la valeur de l'IS est supérieure à l'unité, le composé étudié est considéré comme sélectif sur les parasites. En revanche, si l'IS est inférieur à l'unité, le composé en question est plus cytotoxique qu'antiparasitaire [Tiuman *et al.*, 2005].

L'observation des IS calculés (tableau 44), montre que les molécules actives n'ont pas une sélectivité importante sur les parasites de *Leishmania*.

$CI_{50}\text{ Cellule}/CI_{50}\text{ amastigotes}$	Onosériolide (IS)	Oxyonosériolide (IS)	Spathuléol (IS)
MCF-7/ <i>L. amazonensis</i>	1,2	0,4	1,7
MCF-7/ <i>L. infantum</i>	1,1	0,3	1,6
THP-1/ <i>L. amazonensis</i>	1,6	0,5	2,4
THP-1/ <i>L. infantum</i>	1,5	0,3	2,3
VERO/ <i>L. amazonensis</i>	1,4	0,003	1,9
VERO/ <i>L. infantum</i>	1,4	0,002	1,8

Tableau 44.- Index de sélectivité calculés pour les amastigotes axéniques

4.3.- Activité antiplasmodiale

L'évaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro* a été réalisée sur la souche *P. falciparum* chloroquino-résistante FcB1. Les tests ont été effectués au moyen de la technique radio-isotopique basée sur la méthode décrite par Desjardins *et al.*, [1979] et modifiée par Valentin *et al.*, [1997]. Le test consiste à utiliser comme indicateur de viabilité des parasites,

l'incorporation d'hypoxanthine tritiée dans l'ADN parasite. Les parasites sont maintenus en culture continue selon la méthode décrite par Trager et Jensen, [1976].

Nous observons (tableau 45) que la molécule la plus intéressante est l'onosérioride avec une $CI_{50} = 12,5 \mu M$. La chloranthalactone montre un $CI_{50} = 65,8 \mu M$, ce qui fait d'elle une molécule peu active. L'isobolivianine (molécule nouvelle) avec un $CI_{50} = 39,7 \mu M$ n'est pas non plus une molécule particulièrement intéressante pour son activité antiplasmodiale. Enfin, le spathuléol est aussi peu intéressant car il possède un $CI_{50} = 81,8 \mu M$. Ces données sont détaillées dans le tableau 45.

Les index de sélectivité calculés entre les CI_{50} obtenus sur les trois lignées cellulaires et ceux calculés sur les cultures in vitro *P. falciparum* sont présentés dans le tableau 46.

IC50 Cellule/IC50 P.falciparum	Onosérioride (IS)	Epoxyde (IS)	Spathuléol (IS)	Chloranthalactone A (IS)
MCF-7/ <i>P. falciparum</i>	1,9	0,2	1,6	2,5
THP-1/ <i>P. falciparum</i>	2,6	0,3	2,4	2,6
VERO/ <i>P. falciparum</i>	2,3	0,01	3,1	1,7

Tableau 46.- Résultats d'index de sélectivité calculés en comparant l'activité sur *P. falciparum* et celle mesurée sur les lignées cellulaires

En fonction de ces résultats, on remarque que l'onosérioride qui possède la meilleure CI_{50} sur *P. falciparum* est très faiblement sélectif sur les parasites avec un IS légèrement supérieur à l'unité.

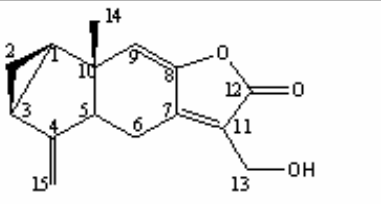
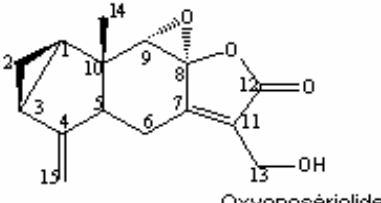
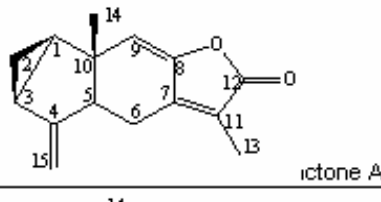
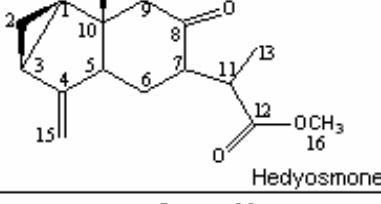
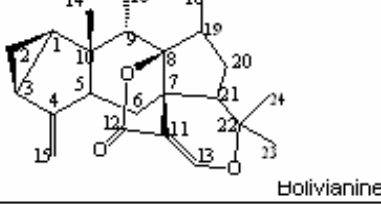
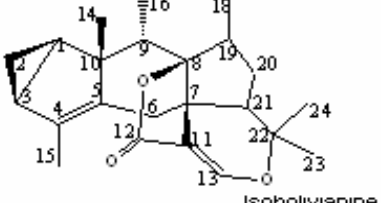
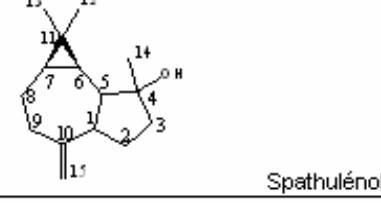
Molécule	Cod	PM (g.M ⁻¹)	<i>P. falciparum</i> FcB1
			CI ₅₀ (µM)
 Onosériolide	M1	244	12,5±0,07
 Oxyonosériolide	M2	260	107,7
 Ictone A	M3	228	65,8
 Hedyosmone	M4	262	110,7
 Bolivianine	M5	378	84,7
 Isobolivianine	M6	378	39,7
 Spathuléol	M7	220	81,8
Chloroquine CI ₅₀	130 nM		

Tableau 45.- Résultats des activités antiplasmodiales
(écart-type calculé sur deux expériences en ce qui concerne l'onosériolide)

4.4.- Discussion sur les résultats biologiques *in vitro*

Les deux molécules de référence (pentamidine et amphotéricine B) utilisées au cours des tests antileishmaniens, amastigotes axéniques et intracellulaires, montrent des CI_{50} proches de celles mentionnées dans la bibliographie [Serenio *et al.*, 2001]. Ces deux molécules, connues comme actives dans la littérature, nous permettent aussi de vérifier la validité et la reproductibilité des tests utilisés.

Parmi les drogues témoins, nous avons aussi testé une fraction contenant 12 alcaloïdes quinoléine obtenus à partir des écorces d'une plante bolivienne *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae) fortement antileishmanienne et en cours d'évaluation clinique [Fournet *et al.*, 1993; Fournet *et al.*, 1989; Giménez *et al.*, 2005]. Cette fraction montre des CI_{50} de 21,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et de 26,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sur *L. amazonensis* et *L. donovani* respectivement [Giménez *et al.*, 2005]. L'utilisation de cette fraction alcaloïdique nous permet de comparer nos résultats (CI_{50} obtenus est de 23,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) avec des CI_{50} d'une drogue d'origine naturelle qui est en phase de développement.

Les lactones sesquiterpéniques sont un groupe important de molécules d'origine naturelle ayant des activités anti-microbiennes, anti-virales, anti-inflammatoires et cytotoxiques. En général ces activités sont dues à la présence d'une γ - lactone possédant un méthylène en position α [Calera *et al.*, 1995; Dirsch *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005].

Cinq des molécules isolées dans nos travaux (**M1**, **M2**, **M3**, **M5** et **M6**) possèdent une γ -lactone et les résultats obtenus montrent qu'elles ont des activités variables.

L'onosériolide, **M1**, décrit pour avoir une activité antinociceptive [Trentin *et al.*, 1999] montre des CI_{50} intéressantes sur les cultures de parasites (surtout sur *P. falciparum*). Ce composé présente une γ - lactone insaturée conjuguée. Par contre l'oxyonosériolide (molécule qui porte l'époxyde **M2**) possède aussi une γ - lactone insaturée non conjuguée avec le reste de la molécule. Wang *et al.* ont proposé, dans le cas de sesquiterpènes isolés de *Atractylodes ovata* (Compositae) que la planéité du cyclopentène pouvait être à l'origine de la cytotoxicité

importante de ces sesquiterpènes [Wang *et al.*, 2002]. Dans notre cas, la conjugaison de trois insaturations de **M1** pourrait être à l'origine de l'activité antiparasitaire plus importante pour **M1** que pour **M2**, qui ne possède pas cette possibilité de conjugaison.

De même la chloranthalactone A (**M3**) présente aussi une γ - lactone insaturée conjuguée mais ne montre que très peu d'activité antiparasitaire ou cytotoxiques. Cela peut être dû à l'absence de la fonction hydroxyle par rapport aux molécules **M1** et **M2**. Ce composé a de plus été déjà décrit comme n'ayant aucune activité anti-tumorale [Wu *et al.*, 2007]. Ce qui confirme les résultats que nous avons obtenus.

Ensuite, nous pouvons voir que **M4** (hedyosmone) n'est active sur aucune des cibles biologiques testées. Cela peut être dû à l'absence de lactone. Les sesterpènes **M5** et **M6** (isobolivianine et bolivianine) ne montrent eux non plus aucune activité. Ils possèdent toutefois une γ - lactone, mais nous pouvons supposer que la rigidité de leurs structures est peut être à l'origine de ce manque d'activité.

Enfin le spathuléol est décrit pour la première fois comme ayant une activité antileishmanienne intéressante dans le test des macrophages parasités. Cette activité reste toutefois à confirmer.

Cette variabilité dans les résultats biologiques peut être due aussi aux problèmes de solubilité que nous avons constaté au long du travail. En effet, la fonction hydroxyle présente sur **M1** et **M2** leur confère une solubilité accrue dans les solvants polaires tels que le méthanol ou les mélanges méthanol/eau. Par contre les autres cinq composés (**M3**, **M4**, **M5**, **M6** et **M7**) ne se dissolvent que dans des solvants organiques peu polaires comme le cyclohexane, le dichlorométhane ainsi que dans l'acétate d'éthyle.

5.- Bilan de l'étude phytochimique bioguidée

- Au total, 7 molécules ont été isolées dont 4 molécules sont nouvelles et présentent des structures originales caractérisées par la présence d'un groupe cyclopropane et d'une γ - lactone à cinq atomes.
- L'évaluation antileishmanienne des molécules isolées montre que la molécule la plus active (**M1**) a une CI_{50} comprise entre 19,8 et 20,9 μ M sur les amastigotes axéniques. Ensuite, sur les test amastigotes axéniques nous retrouvons une activité moyenne de la part du spathuléol (79,8 μ M sur *L. amazonensis* et de 83,3 μ M sur *L. infantum*) et de l'oxynosériolide (57,7 μ M sur *L. amazonensis* et de 90,4 μ M sur *L. infantum*) montrant des activités proches l'une de l'autre et assez faibles.
- L'évaluation de l'activité antileishmanienne sur des amastigotes intramacrophagiques, nous montre que la molécule la plus active et faiblement cytotoxique est le spathuléol, suivi par l'onosériolide. Cette activité sur le modèle intramacrophagique *in vitro*, le plus représentatif de la pathologie, encourage à poursuivre l'étude en mesurant l'activité du spathuléol sur les modèles *in vivo*, après vérification de sa toxicité sur les macrophages. Toutefois ses résultats sont à confirmer.
- En ce qui concerne l'activité antiplasmodiale des molécules isolées, la plus active est l'onosériolide avec une $CI_{50} = 12,5 \mu$ M sur la souche FcB1 de *P. falciparum*. Ce résultat est encourageant, il faudrait approfondir l'étude de cette activité en réalisant d'autres tests *in vivo* ou *in vitro* sur des souches différentes de *Plasmodium*.

IV. Conclusions et perspectives

Mon travail de thèse est inscrit dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox (UMR-152) dont l'un des objectifs est de découvrir de nouveaux candidats médicaments dans le domaine des maladies parasitaires (paludisme, leishmaniose) à partir d'espèces végétales de Guyane, de Bolivie ou du Pérou. La grande diversité végétale peu étudiée que possède la Bolivie ouvre des possibilités variées de trouver de nouveaux métabolites secondaires ayant des activités thérapeutiques antiparasitaires.

Le premier objectif de ce travail a été de contribuer à la valorisation et la protection de la flore bolivienne. L'approche proposée a consisté à choisir une zone d'étude appropriée et à y mettre en place des parcelles permanentes. La zone d'étude se situe au sein du Parc National ou aire protégée de Cotapata PN-ANMI dans le dispositif de Tunquini. Un suivi phénologique a été réalisé durant trois ans sur les parcelles délimitées permettant l'identification de 106 espèces d'arbres différentes regroupés dans 31 familles. L'échantillonnage a permis également la mise en place d'un inventaire taxonomique contribuant à la connaissance floristique de cette région. Le résultat final est une chimiothèque patrimoine vivante qui pourra être valorisée notamment dans le domaine de la santé.

Le second objectif portait sur la valorisation pharmacologique de cette biodiversité végétale du Parc National de Cotapata PN-ANMI, en vue de la recherche d'antiparasitaires contre la leishmaniose et le paludisme. Mon travail a contribué à la valorisation pharmacologique d'une plante bolivienne : *Hedyosmum angustifolium* issue du criblage biologique effectué sur la totalité des espèces échantillonnées à Tunquini. Cette étude phytochimique bioguidée a été réalisée en vue de l'isolement et de l'identification de molécules potentiellement leishmanicides.

L'étude phytochimique bioguidée de l'extrait acétate d'éthyle des écorces de l'espèce *Hedyosmum angustifolium* a conduit à l'isolement de 7 molécules dont quatre sont nouvelles, l'oxyonosériolide (**M2**), l'hedyosmone (**M4**), la bolivianine (**M5**) et l'isobolivianine (**M6**).

L'activité leishmanicide de ces composés a pu être mesurée sur des cultures de promastigotes, d'amastigotes axéniques ainsi que sur des macrophages parasités. Ce dernier test a été effectué en collaboration avec l'UR 008-IRD à Montpellier en collaboration avec le Dr. Denis SERENO.

Les résultats sur l'ensemble des tests biologiques de ces sept composés montrent que :

- L'onosérioride (**M1**) est la molécule la plus active sur les amastigotes axéniques de *L. amazonensis* et *L. infantum*. De plus, cette molécule garde la même activité durant la durée totale de l'essai réalisé sur les amastigotes intramacrophagique (96 heures). Une mesure de son activité sur diverses lignées cellulaires montre que sa sélectivité antiparasitaire est faible. L'activité de l'onosérioride semble moyenne, comparée à ceux de l'amphotéricine et de la pentamidine, mais reste de l'ordre d'autres molécules naturelles actives contre la leishmaniose comme par exemple La fraction alcaloïdique de l'espèce *Galipea longiflora* (Evanta).
- Nous avons également mesuré l'activité antiplasmodiale sur la totalité des molécules. Le composé le plus actif est l'onosérioride avec une $CI_{50} = 12,5 \mu\text{M}$ sur la souche FcB1 de *P. falciparum*. Ce résultat est encourageant. Il serait intéressant de pouvoir évaluer et approfondir l'étude de cette activité en réalisant d'autres tests *in vivo* ou *in vitro* sur des souches différentes de *Plasmodium*.
- Le spathulérol (**M7**) est moyennement actif sur les amastigotes axéniques de *L. amazonensis* et *L. infantum*. Toutefois, l'évaluation de l'activité leishmanicide sur les macrophages infectés nous montre que le spathulérol est la molécule la plus active dans ce modèle et qui est de plus faiblement cytotoxique. Cette activité sur le modèle du macrophage parasité *in vitro* nous suggère de poursuivre l'étude en mesurant l'activité du spathulérol sur les modèles *in vivo*.

Toutefois, on peut dire que nous n'avons pas pu concentrer l'activité biologique, on peut donc supposer que l'activité de départ pourrait être due à la synergie de plusieurs molécules ou à des composés minoritaires présents dans la fraction F2 qui n'ont pas encore été isolés. Grâce à ce travail, nous avons pu mettre en évidence une classe nouvelle de

molécules en isolant un sesterpène de structure originale. D'autres espèces d'*Hedyosmum* étant recensées sur le site de Tunquini, il peut être intéressant de rechercher dans ces dernières ce type de produit. Nous pouvons envisager de rechercher également des intermédiaires biogénétiques pour confirmer ou infirmer notre hypothèse de biogenèse de la Bolivianine. De plus le criblage de la flore de Tunquini donne encore des perspectives de travail.

Les 106 taxons identifiés ont fait l'objet d'une étude bibliographique exhaustive sur l'existence de travaux chimiques et/ou pharmacologiques antérieurs. D'après les criblages biologiques et les données bibliographiques, il serait intéressant de pouvoir approfondir l'étude phytochimique sur les espèces actives qui n'ont pas pu être étudiées comme *Alchornea pearcei*, *Weinmannia dryadifolia* et *Meriania axinioides* qui ont montré des activités antipaludiques intéressantes.

L'ensemble de ces résultats montre que les ressources naturelles des pays tropicaux peuvent être un véritable réservoir de molécules originales susceptibles d'être proposées comme modèle pour des travaux de chimie médicinale. Le champ de recherche est donc particulièrement étendu et prometteur. De plus, cette exploitation des ressources naturelles pourrait permettre de valoriser économiquement et scientifiquement le patrimoine de pays tels que la Bolivie.

V. Matériels et méthodes

1.- Recollecte et échantillonnage du matériel végétal

Le parc a été divisé par Ribera-Arismendi (1995) en cinq biotopes principaux en fonction de l'altitude. Nous avons mis en place six parcelles sur les deux biotopes qui possèdent la population d'arbres la plus importante, qui sont :

La forêt nuageuse (2300 à 3500 m)

Il s'agit d'une forêt relativement basse (10 à 15 m) composée d'arbres tortueux et dont la canopée est recouverte de nombreux épiphytes. Les arbres émergents atteignent jusqu'à 30 m d'altitude. L'étage inférieur est dominé par des lianes et des bambous. Deux parcelles correspondent à ce biotope. Elles sont localisées à des altitudes différentes dans un souci de diversification des espèces rencontrées.

La forêt montagnaise dite des Yungas (1200 à 2300 m)

Le sommet des arbres est ici plus élevé (15 à 20 m) avec des émergents qui dépassent les 30 m. Quatre parcelles correspondent à ce biotope. Leurs emplacements (notamment l'exposition au soleil) ont été choisis de manière à avoir la plus grande diversité floristique.

Les parcelles ont été mises en place entre octobre 2001 et octobre 2002. Un suivi phénologique mensuel a été assuré de 2002 à 2005 dans le but d'obtenir un relevé final comptant un grand nombre d'espèces fertiles et donc identifiables.

Donc, six parcelles de 20 X 20 m ont été ainsi délimitées aux altitudes suivantes :

- 1581 m,
- 1660 m,
- 1720 m,
- 2000 m,
- 2365 m et
- 2730 m ;

Dans chaque parcelle, tous les arbres et les arbustes ont été marqués. Des échantillons botaniques ont été collectés systématiquement et déposés à l'herbier National de Bolivie

(LPB), La Paz, Bolivie. Ces plantes ont été identifiées par un groupe des botanistes boliviens et chaque échantillon a été référencié.

Les parcelles ont les caractéristiques suivantes :

- Parcelle à 1.581 m: S 16°11'600'', O 67° 52'16'', exposition SE, forêt des Yungas intervenue.
- Parcelle à 1.660 m: S 16° 11'646'', O 67° 52'05'', exposition SE, forêt des Yungas.
- Parcelle à 1.720 m: S 16°11'520'', O 67°52'29'', exposition SO, forêt des Yungas intervenue.
- Parcelle à 2.000 m: S 16° 12'815'', O 67°53'27'', exposition NO, forêt humide des Yungas.
- Parcelle à 2.365 m: S 16°11'635'', O 67°53'18'', exposition NO, forêt nuageuse intervenue.
- Parcelle à 2.730 m: S 16°11'968'', O 67°53'52'', exposition NO, forêt nuageuse.

Dans la deuxième partie du projet, des échantillons d'écorce et de feuilles ont été également prélevés sur chaque espèce identifiée afin d'en analyser les propriétés biologiques et chimiques. Ces collectes limitées (100 grammes sec par organe) ont été faites sans mettre en danger la vie des individus prélevés.

1.1.- Préparation des échantillons

Trois voyages de collecte, entre septembre 2001 et septembre 2003, ont été effectués dans le dispositif de Tunquini, au sein du Parc National de Cotapata PN-ANMI. 249 échantillons de feuilles, d'écorces et de tiges ont été collectés, correspondant aux différentes espèces de plantes identifiées.

Les échantillons récoltés ont été séchés à température ambiante et à l'abri de la lumière puis broyés et stockés à l'herbier National de Bolivie (LPB). 2 g de poudre de chaque échantillon ont été extraits à l'éthanol. Les poudres des plantes qui s'avèrent actives ont été envoyées à Toulouse pour la suite du travail de thèse.

2.- Extractions

L'extraction éthanolique

Les 249 échantillons ont d'abord été extraits en petite quantité (2 g de poudre) à l'éthanol avant d'être criblés pour la première fois. Cette technique consiste à mettre en contact la poudre végétale avec de l'éthanol (obtenu après plusieurs distillations, pureté 98%) pendant 24 heures à un rapport de 1/10 (1 g de poudre avec 10 mL de solvant). Ces extractions sont les seules avoir été réalisées au sein de l'Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas (IIFB) de la Facultad de Farmacia, La Paz, Bolivie.

L'extraction successive

Parmi les 249 extraits obtenus, les extraits correspondant à la plante *H. angustifolium* se sont avérés être les plus actifs, cette plante a donc été retenue comme sujet d'étude. La poudre des écorces (10 g) est extraite successivement en commençant par le cyclohexane, suivi de l'acétate d'éthyle et enfin du méthanol. Les étapes de macération faites à l'abri de la lumière durent entre 18 et 24 heures et sont suivies d'une filtration. Le marc resté sur le filtre est remis en contact avec les solvants suivants. Après chaque étape d'extraction, les solvants ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif à vitesse moyenne et à 40 °C. Le rapport entre le matériel à extraire et le volume de solvants utilisés est de 1/10.

Extraction par percolation l'ASE 100 Dionex®

La poudre des écorces est ensuite extraite en grande quantité (entre 250 g et 1 kg) à l'aide du DIONEX ASE 100, « Automatic Sampler Extractor». Cet appareil permet une extraction rapide en utilisant des solvants à températures variables et à pression élevée (100 Bars). Les conditions d'extraction sont :

- Solvant utilisé : Acétate d'éthyle
- Cartouche d'extraction de 100 ml.
- Nombre de cycles : 2.
- Température : 45° C
- Pression : entre 90 et 100 Bars

3.- Méthodes chromatographiques

3.1.- Méthodes chromatographiques analytiques

3.1.1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Tout d'abord cette technique permet de façon générale l'analyse des fractions en ayant une idée de la polarité des différents composés en fonction de l'affinité avec les solvants de migration, donc elle est employée pour la recherche du système de solvant avant d'entreprendre une étape de séparation. Elle est également utilisée à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice Silicagel 60 F254 (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. L'observation des CCM s'effectue sous UV (254 et 365 nm) et, dans certains cas, révélation par les réactifs appropriés. Le réactif utilisé pour le présent travail est le suivant :

Réactif à la Vanilline sulfurique (Révélateur universel).

Préparer une solution composée de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique et de l'éthanol à 95% q.s.p. 100 mL. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 minutes environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.

3.1.2.- Chromatographie liquide haute performance (CLHP/PDA)

Les analyses (CLHP/PDA) ont été effectuées à l'aide d'une chaîne CLHP Varian. Cette appareil est muni de : deux pompes Varian Prepstar 218, deux vannes rhéodyne 7725-018, 2 boucles d'injection (100 µl pour colonne analytique et 2 ml pour colonne semi-préparative),

un détecteur à barrettes de diodes (Varian Prostar 330, PDA Photo Diode Array, détection dans le spectre du visible et dans le spectre UV), 1 Collecteur de fraction (Varian model 701).

Les analyses ont été réalisées en phase inverse avec une colonne CLHP analytique (X-Terra® RP18, 5µm, 4,6x250mm). Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et le débit est fixé à 1 mL.min⁻¹.

En règle générale, pour l'analyse HPLC des extraits bruts, des solutions de 1 à 3 mg.mL⁻¹ de solvant ont été utilisées. Pour toutes les analyses, les conditions chromatographiques ont consisté en un gradient d'acétonitrile/eau. Le solvant d'injection est de composition identique à celui du solvant initial de l'analyse et le volume d'injection fixé à 20 µL.

Conditions chromatographiques particulières :

- Composés **M1** et **M2** : élution selon un gradient MeCN/H₂O : t=0 min 30 % MeCN ; t=15 min 70% MeCN pendant 10 minutes puis retour aux conditions initiales en 5 minutes.
- Composés **M1** et **M2** : élution selon un gradient MeCN/H₂O : t=0 min 40 % MeCN ; t=10 min 60% MeCN pendant 10 minutes puis retour aux conditions initiales en 5 minutes.

3.2.- Méthodes chromatographiques semi-préparatives ou préparatives

3.2.1.- Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)

La chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique, sur colonnes de chromatographie moyenne pression en verre Büchi®. Cette technique permet, en fonction du diamètre de la colonne et en fixant la granulométrie de la silice d'augmenter la résolution d'élution. Dans notre cas, nous avons utilisé deux types de silices en phase normale : Si 60 (40-63µm, Merck), et Si 60 (6-35 µm SDS) préalablement activée quelques heures à l'étuve à 110 °C.

L'échantillon est déposé sous forme solide mélangée à la phase stationnaire. Les systèmes d'élution utilisés sont généralement des mélanges binaires dans des proportions variables au cours de l'élution. La colonne est éluée avec un débit d'environ 20 mL.min⁻¹ et la pression est en moyenne de 2 Bar. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

3.2.2.- Chromatographie SPE sur cartouches de silice normale (Solid Phase Extraction)

Ces colonnes prêtes à l'emploi permettent de purifier des quantités d'extraits inférieurs à 40 mg (de 5 à 40 mg). Ces des cartouches manufacturées de 1 cm de diamètre et contenant 1,0 g ou 0,5 g de silice (SPE Chromatobond Macherey-Nayel). Il faut qu'elles soient imprégnées avec le premier solvant d'élution. Les volumes recueillis sont de 2 ml par fraction.

3.2.3.- Chromatographie préparative sur couche mince

Les composés **M1** et **M2** ont été purifiés par chromatographie préparative sur couche mince. Les plaques utilisées sont des plaques de gel de silice de 1 mm d'épaisseur sur verre (Merck 60 F254). Les échantillons ont été solubilisés dans du dichlorométhane puis déposés sur la plaque à l'aide d'un déposeur automatique Camag ATS4. Les plaques ont été développées dans une cuve saturée contenant le mélange dichlorométhane /Acétate d'éthyle (90/10, V/V).

La plaque a été révélée sous U.V. 254 nm. La silice contenant chacun des composés est ensuite récupérée à l'aide d'une spatule. La silice est dispersée dans une petite quantité de solvant, puis filtrée sous vide pour permettre la récupération des composés.

3.2.4.- Chromatographie liquide haute performance semi-préparative (CLHP semi-prep)

Les purifications ont été effectuées à l'aide d'une chaîne CHLP préparative (CLHP/PDA) Varian. Cette appareil est muni de : deux pompes Varian Prepstar 218, deux vannes rhéodyne 7725-018, 2 boucles d'injection (100 µl pour colonne analytique et 2 ml pour colonne semi-préparative), un détecteur à barrettes de diodes (Varian Prostar 330, PDA

Photo Diode Array, détection dans le spectre du visible et dans le spectre U.V.), 1 Collecteur de fraction (Varian model 701).

Les séparations des composés **M1** et **M2** ont été réalisées sur une colonne XTerra RP18 (Waters) (10 μm , 19 x 250 mm) en utilisant une pré-colonne XTerra RP18 (Waters). Le débit d'élution est de 20,0 mL.min⁻¹. La détection se fait à 270 nm. Le système de solvants employé est MeCN/H₂O (30/70) à (70/30) en 40 minutes

Le composé **M3** a été purifié en colonne phase normale semi-préparative (Lichrospher® 60 A°, Silice, 5 μm , 10,5 x 250mm), la fraction a été éluée par un mélange isocratique 80/20 de cyclohexane/CH₂Cl₂, avec un débit de 5 mL.min⁻¹ et un volume d'injection de 0.5 ml.

4.- Méthodes analytiques

4.1.- Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire a été mesuré en solution sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ($\lambda = 589$ nm) dans une cuve de 1 dm à température ambiante. Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$, exprimé en degré, est calculé à partir de la formule suivante :

$$[\alpha]_D = 1000 \cdot \alpha / l \cdot c$$

(α : angle de rotation, en degré, lu sur le polarimètre, l : longueur de la cuve, en dm, c : concentration de la molécule en solution en g/L)

4.2.- Spectrométrie Infra-rouge (IR)

Les spectres infra-rouge des molécules ont été réalisés au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer Paragon 1000 FT-IR sur des pastilles de KBr.

4.3.- Spectrométrie de masse (MS)

Les spectres de masse en introduction directe et en LC/MS ont été réalisées sur un spectromètre de masse à trappe d'ions LCQ Finnigan® équipé d'une interface d'ionisation APCI et contrôlé par le logiciel Xcalibur. Température de la source : 370 °C ; Débit : 15 μ l/min ; Energie de collision appliquée pour les fragmentations en MS/MS est réglée de manière à obtenir une transmission optimale des ions fils (en général entre 33 % et 40 % de 5 V).

Spectrométrie de masse haute résolution

Les spectres de masse de haute résolution ont été enregistrés en APCI sur le spectromètre MS/MS API 365 (Perkin Elmer Sciex). Ces analyses ont été effectuées au service commun de spectrométrie de masse à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

4.4.- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés au service commun de RMN de l'Université Paul Sabatier de Toulouse sur des appareils de type Brüker Avance 300 et 400 {[fréquences de 300.13 (^1H) et 75.46 MHz (^{13}C)] et [400.13 (^1H) et 100.03 MHz (^{13}C)]}, ou Brüker Avance 500 avec cryosonde [fréquences de 500.13 (^1H) et 125.75 MHz (^{13}C)] selon la quantité de produit à analyser et la résolution souhaitée.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CDCl_3 , C_6D_6 (Euriso-top, Gif – sur - Yvette).

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm, les constantes de couplage sont exprimées en Hz. Les programmes de séquences impulsionsnelles standard fournies par Brüker ont été utilisés pour chaque type d'analyse.

Corrélations homonucléaires

COSY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) : cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^2J et ^3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

NOESY ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule. Le temps de mélange pour toutes les molécules était de 1000 ms sauf pour l'isobolivianine qui a été enregistrée à 1000 ms et 500 ms.

Corrélations hétéronucléaires

HSQC ($^1\text{JH-C}$) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux.

HMBC ($^2\text{JH-C}$, $^3\text{JH-C}$) : cette technique permet la détection des couplages longue distance $^2\text{JH-C}$ et $^3\text{JH-C}$. La valeur de la constante pour $^2\text{J}_{\text{CH}}$ ou de $^3\text{J}_{\text{CH}}$ était standardisée à 8 Hz.

5.- Test biologiques

5.1.- Tests réalisés sur *P. falciparum*

5.1.1.- La culture *in vitro*

La première culture de *P. falciparum* fut réalisée par Trager et Jensen en 1976, ce qui permit un développement considérable de l'étude du parasite et des drogues anti-paludiques. Les tests *in vitro* sur *Plasmodium* nécessitent l'accessibilité permanente à une souche cultivée qui fournit les parasites. Le milieu nutritif est composé de RPMI 1640 (Lonza) enrichi de 10% de sérum humain AB⁺ (Etablissement Français du Sang) et de L-glutamine (2 mM) (acide aminé essentiel) (Lonza). Ce milieu est changé tous les jours afin de renouveler les nutriments et de rehausser le pH (autour de 7,2), les parasites libérant dans le milieu l'acide lactique issu du métabolisme du glucose. Pour une bonne compatibilité sérique, les globules rouges sont de groupe O et de Rhésus positif. La culture, placée dans un incubateur, est maintenue à 37 °C à saturation de vapeur d'eau et CO₂ (5 %). La parasitémie est maintenue à 2% par dilution quotidienne permettant ainsi le développement du parasite dans des conditions optimales. La parasitémie est estimée par comptage visuel au microscope (x 1000) à partir d'un frottis sanguin, coloré au Giemsa. Lorsque la parasitémie est supérieure à 2 %, elle est abaissée par division du culot globulaire centrifugé (avec ajout de globules rouges sains).

5.1.2.- La synchronisation [Lambros et Vanderberg, 1979]

Principe

Les tests biologiques sont réalisés sur une population de parasites de même génération. La synchronisation de la souche repose sur la lyse simultanée de tous les globules rouges parasités par des schizontes. En effet, afin de garantir l'accès aux métabolites plasmatiques, le parasite perméabilise la membrane érythrocytaire mais la rend aussi sensible aux chocs osmotiques. A un stade avancé du parasite, l'ajout de sorbitol dans le milieu lyse les érythrocytes parasités par les schizontes mûrs alors que les autres globules résistent à ce choc.

Il ne reste alors que des globules rouges sains ou des globules parasités par des mérozoïtes et des jeunes trophozoïtes (stade anneaux).

Mode opératoire

La culture est centrifugée (à 500 g pendant 5 min.), le surnageant est remplacé par neuf volumes de solution de D-sorbitol (5 % dans de l'eau distillée). Une fois homogénéisée, la culture est placée à 37°C pendant 10 minutes puis centrifugée (à 500 g pendant 5 min.), ce qui permet d'isoler le culot de globules rouges parasités par des formes anneaux, alors que les lysats cellulaires sont en suspension.

5.1.3.- Evaluation de l'activité antiplasmodiale

Principe

P. falciparum est incapable de synthétiser ex novo les bases puriques (adénine, guanine) contrairement aux bases pyrimidiques (uracile, thymine, cytosine). Il a donc besoin d'utiliser les purines exogènes pour la synthèse de ses nucléotides puriques.

L'hypoxanthine est le précurseur principal utilisé par le parasite pour la synthèse des nucléotides puriques. L'introduction d'hypoxanthine tritiée dans le milieu permet (par suivi de la radioactivité β) de quantifier l'incorporation de ce précurseur dans le parasite et ainsi d'évaluer le développement du parasite. L'incorporation étant plus grande dans les schizontes que dans les anneaux, l'hypoxanthine radio-marquée est introduite un jour après la préparation des plaques.

La souche de *P. falciparum* utilisées sont : la souche FcB1 résistante à la chloroquine ($CI_{50} = 130$ nM) et est originaire de Colombie et la souche F32 sensible à la chloroquine ($CI_{50} = 15$ nM) et est originaire de Tanzanie.

Mode opératoire

Les tests sont réalisés sur des plaques à 96 puits remplis d'un volume fixe d'hématies parasitées (parasitémie de 1 % et hématocrite de 1,5 %). Les fractions à tester (à différentes concentrations) sont alors additionnées en triplicat dans les puits. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, l'hypoxanthine tritiée est ajoutée à raison de 0,25 μ Ci/puits (Perkin Elmer à 1 mCi/ml, France), et les plaques sont remises dans l'incubateur pendant 24 heures. A

la fin du cycle, les plaques sont congelées à -20°C pour provoquer l'hémolyse des érythrocytes. Après décongélation, les acides nucléiques sont collectés sur un filtre à l'aide d'un collecteur de cellules automatique (Perkin Elmer, France). La radioactivité déposée sur le filtre (séché au micro-onde et enveloppé dans un plastique dans lequel sont ajoutés 4 mL de liquide de scintillation (Betaplate Scint, Perkin Elmer) est alors mesurée par un compteur β (Microbeta Trilux, Perkin Elmer).

Détermination de la CI_{50}

La CI_{50} (concentration de l'échantillon qui inhibe 50% de la croissance du parasite) est déterminée par interpolation linéaire. Sur des courbes donnant l'inhibition en pourcentage en fonction de la concentration testée.

5.2.- Tests de cytotoxicité réalisés sur des cellules MCF-7, VERO et THP-1

Il s'agit de mesurer la cytotoxicité d'échantillons sur des cellules MCF-7 (lignées de cellules mammaires cancéreuses humaines) (ATCC), VERO (lignée de cellules de rein de singe) (ATCC) et THP-1 (lignée monocyttaire humaine) (ATCC). La méthode utilisée est basée sur la quantification de l'incorporation de l'hypoxanthine tritiée dans les cellules.

Principe

Comme dans les évaluations antiplasmodiales, les cellules sont capables d'incorporer de l'hypoxanthine tritiée qui est un précurseur de la synthèse des nucléotides puriques. L'introduction d'hypoxanthine tritiée dans le milieu permet (par suivi de la radioactivité β) d'évaluer le développement cellulaire.

Mode opératoire

Les cellules sont dénombrées sur une cellule de Malassez. La culture estensemencée dans une plaque 96 puits à raison de 30 000 cellules par puits dans 200 μL de milieu. Les plaques sont mises dans l'incubateur (24 h à 37°C , à saturation de vapeur d'eau, 5% CO_2). Le 2^{ème} jour, les échantillons sont ajoutés au milieu (DMEM enrichi de 10% de sérum de veau foetal) à différentes concentrations (0,1 ; 1 ; 10 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), puis les plaques sont mises à incuber pendant 24 heures. Au 3^{ème} jour, l'hypoxanthine tritiée est ajoutée à raison de 0,25 $\mu\text{Ci/puits}$ (Perkin Elmer à 1 mCi/mL , France), et les plaques sont remises dans l'incubateur pendant 24 heures de plus. A la fin du cycle, les plaques sont congelées à -20°C pour

provoquer la lyse cellulaire. Après décongélation les acides nucléiques sont collectés sur filtres à l'aide d'un collecteur de cellules automatique (Perkin Elmer, France). La radioactivité déposée sur le filtre (séché au micro-onde et enveloppé dans un plastique dans lequel sont ajoutés 4 mL de liquide de scintillation (Betaplate Scint, Perkin Elmer) est alors mesurée par un compteur β (Microbeta Trilux, Perkin Elmer). La CI_{50} est déterminée comme précédemment pour *P. falciparum*.

5.3.- Tests in vitro réalisés sur *Leishmania sp*

5.3.1.- La culture des promastigotes *in vitro*

Principe

De façon général la culture des *Leishmania sp.* varie en fonction de l'espèce. La culture et le maintien de la forme promastigote permettent le criblage d'un grand nombre d'échantillons ayant comme but l'identification de l'activité antileishmanienne. Les parasites sous cette forme sont extracellulaires, fusiforme possédant un flagelle et se développent chez l'insecte vecteur. La méthode utilisée repose sur l'estimation de l'inhibition de la prolifération des cellules mesurée comme la concentration de formazan dose par spectrophotométrie (figure 87).

Mode opératoire

Les évaluations de bioguidage ont été réalisées sur des cultures des promastigotes de *L. amazonensis*. Les promastigotes sont maintenus à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ par repiquage tous les cinq jours en utilisant le milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL), tamponné avec 25 mM NaHCO_3 (pH = 7,2) et supplémenté avec 20% du sérum bovine fœtal (SVF). Les parasites sont incubés dans des flacons de culture avec une concentration initiale de 5×10^5 parasites par mL [Agnew *et al.*, 2001].

5.3.2.- La culture des amastigotes axéniques *in vitro*

Principe

Les évaluations d'activité antileishmanienne effectuées sur des cultures d'amastigotes axéniques permettent l'obtention des résultats sur la phase responsable des différentes manifestations cliniques chez l'hôte vertébré. En effet, la forme amastigote se développe à

l'intérieur des macrophages. Ils sont adaptés à la vie intracellulaire et de forme ronde ou ovale. La culture des amastigotes axéniques imite parfaitement les conditions biologiques observées *in vivo* c'est-à-dire à l'intérieur du macrophage (pH acide et températures supérieures à 32°C).

Mode opératoire

Les évaluations biologiques ont été réalisées sur deux cultures d'amastigotes axéniques : *L. amazonensis* (clone 1 MHOM/BR/76/LBT-012) [Serenio *et al.*, 2001] et *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-236) [Serenio *et al.*, 2001]. Les parasites sont maintenus par repiquages tout les cinq jours en utilisant le milieu MAA/20 avec un pH = 5,8 (Milieu de croissance Axénique pour Amastigote). Ce milieu est préparé à partir du milieu modifié 199 (Gibco BRL) supplémenté avec 0,5% de Trypto Caséine de Soja (Sanofi Diagnostics Pasteur), 15 mM de D-Glucose (Sigma), 5 mM de L-Glutamine (Lonza), 25 mM d'HEPES (Lonza), 4 mM de NaHCO₃ (Lonza), 0,023 mM d'hémine (Sigma) et 20 % de sérum bovin fœtal (SVF) (Lonza). Les amastigotes axéniques de *L. amazonensis* sont maintenus à 32 ± 1°C et ceux de *L. infantum* à 36 ± 1°C à saturation de vapeur d'eau et CO₂ (5%) [Serenio et Lemesre, 1997a].

5.3.3.- Evaluation de l'activité antileishmanienne *in vitro* sur *L. amazonensis*

Principe

L'activité antileishmanienne sur les formes promastigote et amastigote axénique de *L. amazonensis* a été déterminée par spectrophotométrie à l'aide de la technique colorimétrique du MTT. Le test est basé sur la transformation d'un sel de tétrazolium MTT [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)] en formazan par réduction enzymatique (figure 87). En bref, le cycle tétrazolique qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Le formazan est un produit coloré (violet foncé), insoluble dans l'eau et l'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique [Serenio et Lemesre, 1997b].

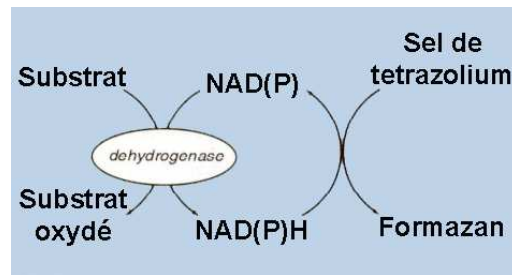


Figure 87.- Schéma de la réaction simplifiée conduisant à la formation du formazan

Mode opératoire

Les parasites sont dénombrés sur une cellule de Malassez puis ensemencés dans une plaque de 96 puits à une concentration de 2×10^5 parasites/puits dans 90 μL de milieu. Les échantillons à tester (à concentrations finales de 0,1 ; 1 ; 10 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ainsi que l'amphotéricine B (Sigma) (0,01 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 10 μM) sont alors additionnés en triplicat dans les puits pour un volume additionnel de 10 μL . Après 72 heures d'incubation (à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les promastigotes et à $32 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les amastigotes) on ajoute un volume de 10 μL de MTT (Sigma) (10 mg.mL^{-1}) et les plaques sont remises dans les incubateurs. Après 3 heures et demi d'incubation, la réaction de réduction est arrêtée par ajout d'une solution d'isopropanol 50% et SDS 10% (SDS : pH 5,4). Puis les plaques sont remises à incuber pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque puits est mesurée à 600 nm sur un lecteur de microplaques Merteck, modèle 960.

Détermination de la CI_{50}

La CI_{50} (concentration de l'échantillon qui inhibe 50% de la croissance du parasite) est déterminée par interpolation linéaire. Sur des courbes donnant l'inhibition en pourcentage en fonction de la concentration testée.

5.3.4.-Evaluation de l'activité antileishmanienne *in vitro* sur *L. infantum*

Principe

Les activités antileishmaniennes sur *L. infantum* sont déterminées grâce à la mesure de l'émission de la lumière. Pour cela nous avons utilisé des cultures d'amastigotes axéniques, de *L. infantum*, transfectées par le gène de la luciférase ($\alpha \text{ Neo } \alpha \text{ Luc}$). Cette transformation permet aux parasites d'émettre de la lumière en présence d'ATP et de la luciférine, ce qui permet de calculer la concentration des parasites présents dans le milieu. C'est une méthode

non destructive basée sur le principe de la catalyse du substrat luciférine avec l'ATP afin de générer des photons lumineux [Serenio *et al.*, 2001]. Ces amastigotes axéniques sont maintenus en culture à 36 ± 1 °C, selon les conditions décrites précédemment [Serenio et Lemesre, 1997a].

Mode opératoire

Les parasites sont dénombrés sur une cellule de Malassez puisensemencés dans une plaque de 96 puits à une concentration de 1×10^4 parasites/puits dans 90 µL de milieu. Ensuite on ajoute les échantillons à tester (à concentrations finales de 0,1 ; 1 ; 10 et 100 µg/ml) ainsi que la pentamidine (0,01 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 10 µM) en triplicat pour un volume additionnel de 10µL dans chaque puits. Après 72 heures d'incubation on ajoute 50 µL par puits de tampon luciférase (Promega) puis on vérifie la lyse des cellules et on lit les plaques sur le lecteur de luminescence VICTOR.

5.3.5. Evaluation de l'activité antileishmanienne *in vitro* sur la phase intramacrophagique

Principe

Nous avons quantifié l'activité antileishmanienne sur le modèle intramacrophagique à l'aide d'une technique qui implique l'infection des macrophages par des amastigotes de *L. infantum* transfectés par le gène de la luciférase (α Neo α Luc) (utilisé précédemment pour la quantification des amastigotes axéniques) [Lang *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2000; Serenio *et al.*, 2001]. La détection de l'activité s'effectue à l'aide d'un luminomètre VICTOR.

Mode opératoire

Ce test s'effectue à l'aide de cultures de monocytes **THP-1** et de cultures d'amastigotes axéniques de *Leishmania infantum* clone 1 (MHOM/MA/67/ITMAP-236).

Transformation de monocytes THP-1 à macrophages

Tout d'abord, les cellules THP-1 sont dénombrées sur une cellule de Malassez. La culture estensemencée dans une plaque 96 puits à raison de 2×10^4 cellules par puits dans 100 µL de milieu. Afin de déclencher la transformation de monocytes en macrophages on ajoute 40 ng.mL^{-1} de phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma) puis les plaques sont incubées pendant 48 heures. La culture de monocytes est maintenue à 36 ± 1 °C dans un air humidifié et

enrichi en CO₂ (5%) en utilisant comme milieu de culture le RPMI supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal (SVF).

Infection des macrophages

Après les 48 heures d'incubation les macrophages sont infectés avec les amastigotes axéniques de *L. infantum*. Pour cela est rincé deux fois chaque puits avec 100 µL de RPMI (supplémenté avec 10% SVF) puis on ajoute les parasites dans un volume de milieu de 100 µL. En effet, la concentration de parasites est de 32×10^5 parasites par mL, ce qui correspond à un ratio d'infection entre les parasites et les cellules de 16/1. Puis les plaques sont mises à incuber pendant 4 heures.

Contact avec les différentes concentrations de drogues à tester

Après ce temps d'incubation, on rince une seule fois chaque puits avec 100 µL de RPMI 10% SVF, puis on ajoute 90 µL RPMI 10% SVF plus 10 µL de chaque échantillons à tester (à concentrations finales de 0,1 ; 1 ; 10 et 100 µg/ml) ainsi que la pentamidine (0,01 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 10 µM) en triplicat. Puis les plaques sont mises à incuber à 37°C et 5% CO₂.

Lectures des plaques

Les lectures des plaques se réalisent au bout de 24, 48, 72 et 96 heures, dans cette partie on prélève 90 µL de surnageant. Ensuite on ajoute 40 µL de tampon de lyse GLO (Promega), on attend entre 7 et 9 minutes en vérifiant la lyse cellulaire à l'aide d'une microscopie, puis on ajoute 40µL de tampon luciférase. Pour finir, on mélange chaque puits, on préleve 70 µL de surnageant et on transfère sur une plaque blanche, à lire sur un luminomètre VICTOR.

VI. Références bibliographiques

- Agnew, P., Holzmuller, P., Michalakakis, Y., Sereno, D., Lemesre, J. L., Renaud, F., **2001**. *In Vitro Growth of Leishmania amazonensis Promastigotes Resistant to Pentamidine Is Dependent on Interactions among Strains*. vol. 45. Am Soc Microbiol. pp. 1928-1929.
- Akendengue, B., Ngou-Milama, E., Laurens, A., Hocquemiller, R., **1999**. *Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products*. Parasite. 6, 3-8.
- Alrajhi, A. A., Ibrahim, E. A., De Vol, E. B., Khairat, M., Faris, R. M., Maguire, J. H., **2002**. *Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major*, *N Engl J Med* 346 Full Text via CrossRef View Record in Scopus Cited By in Scopus. 891–895.
- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R., Moreno, J., **1997**. *Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years*. Am Soc Microbiol.
- Azebaze, A. G. B., Dongmo, A. B., Meyer, M., Ouahouo, B. M. W., Valentin, A., Nguemfo, E. L., Nkengfack, A. E., Vierling, W., **2007**. *Antimalarial and vasorelaxant constituents of the leaves of Allanblackia monticola (Guttiferae)*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 101, 23-30.
- Balick, M. J., Mendelsohn, R., **1992**. *Assessing the Economic Value of Traditional Medicines from Tropical Rain Forests*. Conservation Biology. 6, 128-130.
- Balunas, M. J., Jones, W. P., Chin, Y. W., Mi, Q., Farnsworth, N. R., Soejarto, D. D., Cordell, G. A., Swanson, S. M., Pezzuto, J. M., Chai, H. B., **2006**. *Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project*. Chemistry & Biodiversity. 3, 897.
- Banzouzi, J. T., Prado, R., Menan, H., Valentin, A., Roumestan, C., Mallie, M., Pelissier, Y., Blache, Y., **2002**. *In vitro antiplasmodial activity of extracts of Alchornea cordifolia and identification of an active constituent: ellagic acid*. Journal of Ethnopharmacology. 81, 399-401.
- Bercion, S., De K Martin, M. A. C., Baltaze, J. P., Bourgeois, P., **2005**. *A new α -methylene γ -lactone sesquiterpene from Hedyosmum arborescens*. Fitoterapia (Milano) 76, 620-624.
- Berman, J., **2003**. *Current treatment approaches to leishmaniasis*. Curr Opin Infect. Dis 16, 397-401.
- Berman, J., **2005**. *Clinical status of agents being developed for leishmaniasis*. Expert Opin. Investig. Drugs. 14, 1337-1346.
- Berman, J. D., Lee, L. S., **1984**. *Activity of Antileishmanial Agents against Amastigotes in Human Monocyte-Derived Macrophages and in Mouse Peritoneal Macrophages*. The Journal of parasitology. 70, 220-225.

- Bern, C., **2000**. *Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 63, 184-188.
- Bernart, M. W., Cardellina, J. H., Balaschak, M. S., Alexander, M. R., Shoemaker, R. H., Boyd, M. R., **1996**. *Cytotoxic falcarinol oxylipins from Dendropanax arboreus*. J. Nat. Prod. 59, 748-753.
- Bigdeli, M., Hashkavaii, A., Rustaiyan, A., **2004**. *A review on biological effect of Cleome L. and identification of the compositions of Cleome coluteoides essential oil*. Agricultural Research and education organization. 3, 9-14.
- Birdsall, T. C., Kelly, G. S., **1997**. *Berberine: therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants*. Altern. Med. Rev. 2, 94-103.
- Boelaert, M., El Safi, S., Mousa, H., Mbat, J., Gurubacharya, V. L., Shrestha, J., Jacquet, D., De Muynck, A., Le Ray, D., Boelaert, M., **1999a**. *Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis*. Tropical Medicine and International Health. 4, 31-37.
- Boelaert, M., Lynen, L., Desjeux, P., Van der Stuyft, P., **1999b**. *Cost-effectiveness of competing diagnostic-therapeutic strategies for visceral leishmaniasis*. Bulletin of the World Health Organization. 77, 667-674.
- Bohlmann, F., Zdero, C., King, R. M., Robinson, H., **1980**. *Onoseriolid, ein neues sesquiterpenlacton aus Onoseris albicans*. Phytochemistry. 19, 689-691.
- Bose, A., Gupta, J. K., Ghosh, T., Banerjee, M., Dinda, A., **2005**. *Physico-chemical studies and fatty acid composition of cleome rutidosperma seed oil*. Journal of Teaching and Research in Chemistry. 12, 129-132.
- Botero, D., **2006**. Parasitosis humanas. Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Braca, A., Mendez, J., Menichini, F., Morelli, I., **2002**. *Constituents of Alchornea triplinervia (Euphorbiaceae)*. Biochemical Systematics and Ecology. 30, 1109-1111.
- Bruneton, J., **1999**. *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales*. Paris.
- Burke, A. B., Chan, W. R., Honkan, V. A., **1980**. *The structure of cleomeolide, an unusual bicyclic diterpene from Cleome viscosa L. (Capparaceae)*. Tetrahedron. 36, 3489-3493.
- Caballero-George, C., Vanderheyden, P. M. L., Solis, P. N., Pieters, L., Shahat, A. A., Gupta, M. P., Vauquelin, G., Vlietinck, A. J., **2001**. *Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques*. Phytomedicine. 8, 59-70.
- Cabral, M. M., Mendonca, P. M., Gomes, C. M., Barbosa-Filho, J. M., Dias Cda, S., Soares, M. J., Queiroz, M. M., **2007**. *Biological activity of yangambin on the postembryonic*

- development of Chrysomya megacephala (Diptera: Calliphoridae)*. J Med Entomol. 44, 249-255.
- Calera, M. R., Soto, F., Sanchez, P., Bye, R., Hernandez-Bautista, B., Anaya, A. L., Lotina-Hennsen, B., Mata, R., **1995**. *Biochemically active sesquiterpene lactones from Ratibida mexicana*. Phytochemistry. 40, 419-425.
- Calixto, J. B., Scheidt, C., Otuki, M., Santos, A. R. S., **2001**. *Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs*. Expert Opinion on Emerging Drugs. 6, 261-279.
- Cardenas, L. C., Rodriguez, J., Villaverde, M. C., Riguera, R., Cadena, R., Otero, J. A., **1993**. *The analgesic activity of Hedyosmum bonplandianum: flavonoid glycosides*. Planta Med. 59, 26-27.
- Carrizosa, U. J., **1990**. *La selva andina*. Selva y futuro. Bogotá: Ed. El Sello. 151-184.
- Carvalho, P. B., Ferreira, E. I., **2001**. *Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease-Review*. Fitoterapia. 72, 599-618.
- Chan-Bacab, M. J., Peña-Rodríguez, L. M., **2001**. *Plant natural products with leishmanicidal activity*. Nat. Prod. Rep. 18, 674-688.
- Chang, K. C., Duh, C. Y., Chen, I. S., Tsai, I. L., **2003**. *A cytotoxic butenolide, two new dolabellane diterpenoids, a chromaffin and a benzoquinol derivative from Formosan Casearia membranacea*. Plant Med. 69, 667.
- Chen, C. M., Jan, F. Y., Chen, M. T., Lee, T. J., **1989**. *Constituents of formosan antitumor folk medicine. II. Peperomins A, B and C, novel secolignans from Peperomia japonica*. Heterocycles 29, 411-414.
- Colectivo, **2003**. *Madidi de Bolivia, Mágico, Único y Nuestro. Agroecología Sierra y Selva. CARE, CBF-IE, HBN-IE, PNaNMI Madidi*. SERNAP, WCS. Comunidad Europea.
- Compagnone, R., Castillo, A., Sciacovelli, L., Delle Monache, F., **1997**. *Arabinofuranoside Flavonoids From Tapirira Guianensis*. Boletín Sociedad Chilena de Química. 42, 445-448.
- Cordell, G. A., **2000**. *Biodiversity and drug discovery--a symbiotic relationship*. Phytochemistry. 55, 463-480.
- Correia, S. J., David, J. P., David, J. M., **2003**. *Constituents of the bark of Tapirira guianensis (Anacardiaceae)*. Química Nova. 26, 36-38.
- Croft, S. L., Barrett, M. P., Urbina, J. A., **2005**. *Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis*. Trends in Parasitology. 21, 508-512.
- Croft, S. L., Coombs, G. H., **2003**. *Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs*. Trends Parasitol. 19, 502-508.

- Croft, S. L., Sundar, S., Fairlamb, A. H., **2006**. *Drug Resistance in Leishmaniasis*. Clinical Microbiology Reviews. 19, 111-126.
- Cronquist, A., 1988. The evolution and classification of flowering plants. [Ed. by] The New York Botanical Garden. NY VIII.
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Cañavate, C., Desjeux, P., Alvar, J., **2006**. *Leishmania/HIV co-infections in the second decade*. Indian J. Med. Res. 123, 357-388.
- Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., **2005**. *Chemistry and biological activity of polyisoprenylated benzophenone derivatives*. Studies in Natural Products Chemistry. 32, 671-720.
- David, J. M., Chavez, J. P., Chai, H. B., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A., **1998**. *Two new cytotoxic compounds from Tapirira guianensis*. J. Nat. Prod. 61, 287-289.
- de Carvalho, P. B., Ferreira, E. I., **2001**. *Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease*. Fitoterapia. 72, 599-618.
- de Fatima Arrigoni-Blank, M., Dmitrieva, E. G., Franzotti, E. M., Antonioli, A. R., Andrade, M. R., Marchioro, M., **2004**. *Anti-inflammatory and analgesic activity of Peperomia pellucida (L.) HBK (Piperaceae)*. Journal of Ethnopharmacology. 91, 215-218.
- Dedet, J. P., 1999. Les Leishmanioses. Ellipses Paris, France.
- Deem, S. L., Davis, R., Pacheco, L. F., **2004**. *Serologic Evidence of Nonfatal Rabies Exposure in a Free-ranging Oncilla (Leopardus tigrinus) in Cotapata National Park, Bolivia*. vol. 40. Wildlife Dis Assoc. pp. 811-815.
- Desjardins, R. E., Canfield, C. J., Haynes, J. D., Chulay, J. D., **1979**. *Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 16, 710-718.
- Desjeux, P., **1996**. *Leishmaniasis Public health aspects and control*. Clinics in Dermatology. 14, 417-423.
- Desjeux, P., **2001**. *Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis*. Medical Microbiology and Immunology. 190, 77-79.
- Desjeux, P., **2004**. *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27, 305-318.
- Devi, B. P., Boominathan, R., Mandal, S. C., **2003**. *Evaluation of antipyretic potential of Cleome viscosa Linn.(Capparidaceae) extract in rats*. Journal of Ethnopharmacology. 87, 11-13.
- Dirsch, V. M., Stuppner, H., Ellmerer-Muller, E. P., Vollmar, A. M., **2000**. *Structural requirements of sesquiterpene lactones to inhibit LPS-induced nitric oxide synthesis in RAW 264.7 macrophages*. Bioorg. Med. Chem. 8, 2747-2753.

- Dodson, C. H., Gentry, A. H., **1991**. *Biological Extinction in Western Ecuador*. Annals of the Missouri Botanical Garden. 78, 273-295.
- Fournet, A., Barrios, A. A., Muñoz, V., **1994a**. *Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants*. J. Ethnopharmacol. 41, 19-37.
- Fournet, A., Barrios, A. A., Munoz, V., Hocquemiller, R., Roblot, F., Cavé, A., Richomme, P., Bruneton, J., **1994b**. *Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from Galipea longiflora, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis*. Phytother. Res. 8, 174-178.
- Fournet, A., Ferreira, M. E., Rojas De Arias, A., Torres De Ortiz, S., Fuentes, S., Nakayama, H., Schinini, A., Hocquemiller, R., **1996**. *In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania amazonensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40, 2447-2451.
- Fournet, A., Gantier, J. C., Gautheret, A., Leysalles, L., Munos, M. H., Mayrargue, J., Moskowitz, H., Cave, A., Hocquemiller, R., **1994c**. *The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with Leishmania donovani*. J. Antimicrob. Chemother. 33, 537-544.
- Fournet, A., Hocquemiller, R., Roblot, F., Cavé, A., Richomme, P., Bruneton, J., **1993**. *Les Chimanimines, Nouvelles Quinolines Substituées en 2, Isolées d'Une Plante Bolivienne Antiparasitaire: Galipea longiflora*. Journal of Natural Products. 56, 1547-1552.
- Fournet, A., Munoz, V., **2002**. *Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs*. Curr. Top. Med. Chem. 2, 1215-1237.
- Fournet, A., Vagneur, B., Richomme, P., Bruneton, J., **1989**. *Aryl-2 et alkyl-2 quinoléines nouvelles isolées d'une Rutacée bolivienne: Galipea longiflora*. Canadian Journal of Chemistry. 67, 2116-2118.
- Gaceta, Oficial, de, Bolivia, **1997**. *Reglamento de la decision 391 de la Comision de Acuerdo de Cartagena*.
- Decreto Supremo N° 24676, 21 de Junio, La Paz, Bolivia.
- Ganguly, N. K., **2002**. *Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis*. TDR News 68.
- Garcez, W. S., Garcez, F. R., Silva, L., Shimabukuro, A. A., **2005**. *Indole alkaloid and other constituents from Ocotea minarum*. Journal of the Brazilian Chemical Society. 16, 1382-1386.
- Garlapati, S., Dahan, E., Shapira, M., **1999**. *Effect of acidic pH on heat shock gene expression in Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. 100, 95-101.

- Gavvani, A. S. M., Hodjati, M. H., Mohite, H., Davies, C. R., **2002**. *Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched cluster randomised trial*. The Lancet. 360, 374-379.
- Gentry, A. H., **1993**. *Patterns of diversity and floristic composition in Neotropical Montane Forests*. In: Churchill, Steven P.; Balslev, Henrik; Forero, Enrique; Luteyn, James L.(eds.). Neotropical Montane Forest Biodiversity and Conservation Symposium (1993, Bronx, NY, USA). Biodiversity and conservation of neotropical montane forests: Proceedings.
- Germonprez, N., Maes, L., van Puyvelde, L., Van Tri, M., Tuan, D. A., Kimpe, N., **2005**. *In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from Maesa balansae and some chemical derivatives*. Journal of Medicinal Chemistry. 48, 32-37.
- Giménez, A., Avila, J. A., Ruiz, G., Paz, M., Udaeta, E., Ticona, J. C., Salamanca, E., Paredes, C., Rodriguez, N., Quints, K., Chuqui, R., Quenevo, C., Dalence, M. F., Bascope, M., **2005**. *Estudios Quimicos, Biologicos y Farmacologicos de Galipea longiflora, Krause*. Revista Boliviana de Quimica. 22, 94-107.
- Grogl, M., Thomason, T. N., Franke, E. D., **1992**. *Drug Resistance in Leishmaniasis: Its Implication in Systemic Chemotherapy of Cutaneous and Mucocutaneous Disease*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 47, 117.
- Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., Bryceson, A. D. M., **2002**. *Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda*. Lancet Infectious Diseases. 2, 494-501.
- Gupta, M. P., **2006**. *Medicinal plants originating in the andean high plateau central valleys region of Bolivia, Ecuador and Peru*. Report UNIDO.
- Handman, E., **2001**. *Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development*. Clinical Microbiology Reviews. 14, 229-243.
- Harrowven, D. C., Newman, N. A., Knight, C. A., **1998**. *On the Identity of a Neo-lignan from the Fruits of Virola Sebifera*. Tetrahedron letters. 39, 6757-6760.
- Henderson, A., Churchill, S. P., Luteyn, J. L., **1991**. *Neotropical plant diversity*. Nature. 351, 21-22.
- Hostettmann, K., Wolfender, J. L., **1997**. *The search for biologically active secondary metabolites*. Pesticide Science. 51, 471-482.
- Ibisch, P. L., **2003**. *La diversidad de especies: Bolivia es un país megadiverso, subestimado y subinvestigado*. Biodiversidad: La riqueza de Bolivia (PL Ibisch yG Mérida, eds.). Editorial FAN. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. 89-90.

- Ibisch, P. L., Beck, S., **2003**. *La diversidad biológica: espermatófitas*. Biodiversidad: La Riqueza de Bolivia.(este es el que habla de los valores dediversidad). Editorial Fundación Amigos de la Naturaleza (FAN), Santa Cruz. 103–112.
- Iinuma, M., Tosa, H., Tanaka, T., Asai, F., Kobayashi, Y., Shimano, R., Miyauchi, K., **1996**. *Antibacterial activity of xanthones from guttiferaeous plants against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J. Pharm. Pharmacol. 48, 861-865.
- Inagaki, F., Abe, A., **1985**. *Analysis of ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of spathulenol by two-dimensional methods*. Perkin transactions. 2, 1773-1778.
- Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Felton, J. M., Sabin, A. J., Horton, J., **2005**. *A Phase II Dose-Ranging Study of Sitamaquine for the treatment of Visceral Leishmaniasis in India*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 73, 1005-1011.
- Joshi, P. K., Rawat, G. S., Padilya, H., Roy, P. S., **2006**. *Biodiversity Characterization in Nubra Valley, Ladakh with Special Reference to Plant Resource Conservation and Bioprospecting*. Biodiversity and Conservation. 15, 4253-4270.
- Judd, W. S., Kellogg, E. A., Stevens, P., Campbell, C. S., Bouharmont, J., Evrard, C. M., **2002**. *Botanique systématique: une perspective phylogénétique*. De Boeck Université.
- Jullian, V., Bonduelle, C., Valentin, A., Acebey, L., Duigou, A. G., Prevost, M. F., Sauvain, M., **2005**. *New clerodane diterpenoids from Laetia procera (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 15, 5065-5070.
- Katakura, K., Kawazu, S. I., Naya, T., Nagakura, K., Ito, M., Aikawa, M., Qu, J. Q., Guan, L. R., Zuo, X. P., Chai, J. J., **1998**. *Diagnosis of Kala-Azar by Nested PCR Based on Amplification of the Leishmania Mini-Exon Gene*. Journal of Clinical Microbiology. 36, 2173-2177.
- Kato, M. J., Lopes, L. M. X., Yoshida, M., Gottlieb, O. R., **1985**. *Acyresorcinols from Virola sebifera and Virola elongata*. Phytochemistry. 24, 533-536.
- Kawabata, J., Fukushi, E., Mizutani, J., **1993**. *Symmetric sesquiterpene dimer from Chloranthus serratus*. Phytochemistry. 32, 1347-1349.
- Kawabata, J., Fukushi, E., Mizutani, J., **1995**. *Sesquiterpene dimers from Chloranthus japonicus*. Phytochemistry. 39, 121-125.
- Kawabata, J., Fukushi, E., Mizutani, J., **1998**. *Sesquiterpene dimer and trimer from Chloranthus japonicus*. Phytochemistry. 47, 231-235.
- Kawabata, J., Fukushi, Y., Tahara, S., Mizutani, J., **1985**. *Structures of Novel Sesquiterpene Ketones from Chloranthus serratus (Chloranthaceae)*. Agricultural and Biological Chemistry. 49, 1479-1485.
- Kawabata, J., Fukushi, Y., Tahara, S., Mizutani, J., **1990**. *Shizukaol A, a sesquiterpene dimer from Chloranthus japonicus*. Phytochemistry. 29, 2322-2334.

- Kawabata, J., Mizutani, J., **1988**. *Distribution of Lindenanolides in the Chloranthaceae*. Agricultural and Biological Chemistry. 52, 2965-2966.
- Kawabata, J., Mizutani, J., **1989**. *Shizukanolides D, E and F, Novel Lindenanolides from Chlornthus spp.(Chloranthaceae)*. Agricultural and Biological Chemistry. 53, 203-207.
- Kawabata, J., Mizutani, J., **1992**. *Dimeric sesquiterpenoid esters from Chloranthus serratus*. Phytochemistry. 31, 1293-1296.
- Kawabata, J., Tahara, S., Mizutani, J., **1981**. *Isolation and Structural Elucidation of Four Sesquiterpenes from Chloranthus japonicus (Chloranthaceae)*. Agricultural and Biological Chemistry. 45, 1447-1453.
- Kawanishi, K., Uhara, Y., Hashimoto, Y., **1985**. *Alkaloids from the hallucinogenic plant Virola sebifera*. Phytochemistry. 24, 1373-1375.
- Kayser, O., Kiderlen, A. F., Croft, S. L., **2003**. *Natural products as antiparasitic drugs*. Parasitology Research. 90, 55-62.
- Khan, M. R., Omoloso, A. D., **2002**. *Antibacterial activity of Hygrophila stricta and Peperomia pellucida*. Fitoterapia. 73, 251-254.
- Killick-Kendrick, R., **1990**. *Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review*. Med. Vet. Entomol. 4, 1-24.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Pinelli, E., Del Real, G., Molina, R., Vitutia, M. M., Canavate, M. C., Nieto, J., **1994**. *A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with Leishmania infantum promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies*. Parasite. 1, 311-318.
- Krebs, H. C., Rakotoarimanga, J. V., Habermehl, G. G., **1990**. *Isolation of Spatulanol and (-)-Caryophyllene Oxide from Vernonia mollissima Don and'H and*. Magnetic Resonance in Chemistry. 28, 124-128.
- Kromer, T., Kessler, M., Gradstein, S. R., Acebey, A., **2005**. *Diversity patterns of vascular epiphytes along an elevational gradient in the Andes*. Journal of Biogeography. 32, 1799-1809.
- Kwok, B. H., Koh, B., Ndubuisi, M. I., Eloffsson, M., Crews, C. M., **2001**. *The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb feverfew directly binds to and inhibits IB kinase*. Chem. Biol. 8, 759-766.
- Kwon, H. C., Lee, K. R., Zee, O. P., **1997**. *Cytotoxic Constituents of Pilea mongolica*. Archives of Pharmacal Research. 20, 180-183.
- Kwon, O. E., Lee, H. S., Lee, S. W., Bae, K., Kim, K., Hayashi, M., Rho, M. C., Kim, Y. K., **2006**. *Dimeric sesquiterpenoids isolated from Chloranthus japonicus inhibited the expression of cell adhesion molecules*. Journal of Ethnopharmacology. 104, 270-277.

- Lambros, C., Vanderberg, J. P., **1979**. *Synchronization of Plasmodium falciparum Erythrocytic Stages in Culture*. The Journal of parasitology. 65, 418-420.
- Lamikanra, A., Ogundaini, A. O., Ogungbamila, F. O., **1990**. *Antibacterial constituents of Alchornea cordifolia leaves*. Phytotherapy Research .4, 198–200.
- Lang, T., Goyard, S., Lebastard, M., Milon, G., **2005**. *Bioluminescent Leishmania expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboured macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice*. Cellular Microbiology. 7, 383-392.
- Le Pont, F., Desjeux, P., Torres Espejo, J. M., Fournet, A., Mouchet, J., Rioux, J. A., **1992**. *Leishmanioses et phlébotomes en Bolivie*.
- Lee, L. T., Chang, S. F., Lee, C. Y., Chiou, S. J., Tong, T. S., **2005**. *Extract from the roots or stems of urticaceae for hepatitis B therapy*.
- Lewis, W. H., Lamas, G., Vaisberg, A., Corley, D. G., Sarasara, C., **1999**. *Peruvian Medicinal Plant Sources Of New Pharmaceuticals (International Cooperative Biodiversity Group-Peru)*. Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy) 37, 69-83.
- Lira, R., Sundar, S., Makharia, A., Kenney, R., Gam, A., Saraiva, E., Sacks, D., **1999**. *Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of Leishmania donovani*. J. Infect. Dis. 180, 564-567.
- Lopes, L. M. X., Yoshida, M., Gottlieb, O. R., **1982**. *The chemistry of Brazilian Myristicaceae. XVI. 1, 11-Diarylundecan-1-one and 4-aryltetralone neolignans from Virola sebifera*. Phytochemistry. 21, 751-755.
- Lopes, L. M. X., Yoshida, M., Gottlieb, O. R., **1983**. *Dibenzylbutyrolactone lignans from Virola sebifera*. Phytochemistry. 22, 1516-1518.
- Lopes, L. M. X., Yoshida, M., Gottlieb, O. R., **1984a**. *Aryltetralone and arylindanone neolignans from Virola sebifera*. Phytochemistry. 23, 2021-2024.
- Lopes, L. M. X., Yoshida, M., Gottlieb, O. R., **1984b**. *Further lignoids from Virola sebifera*. Phytochemistry. 23, 2647-2652.
- Lorenzo, D., Loayza, I., Dellacassa, E., **2003**. *Composition of the essential oils from leaves of two Hedyosmum spp. from Bolivia*. Flavour and Fragrance Journal. 18, 32-35.
- Maes, L., Berghe, D. V., Germonprez, N., Quirijnen, L., Cos, P., De Kimpe, N., Van Puyvelde, L., **2004**. *In Vitro and In Vivo Activities of a Triterpenoid Saponin Extract (PX-6518) from the Plant Maesa balansae against Visceral Leishmania Species*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48, 130.

- Martinez, V. J. C., Aldana, J. M. I., Cuca, S. L. E., **1999**. *Dibenzylbutane lignans from *Virola sebifera* leaves*. *Phytochemistry*. 50, 883-886.
- Mavar-Manga, H., Chapon, D., Hoet, S., Block, S., De Pauw-Gillet, M.-C., Quetin-Leclercq, J., **2006**. *N1,N2,N3-trisisopentenyl guanidine and N1,N2-diisopentenyl guanidine, two cytotoxic alkaloids from *Alchornea cordifolia* (Schumach.& Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae) root barks*. *Natural Product Communications*. 1, 1097-1100.
- Mbwambo, Z. H., Apers, S., Moshi, M. J., Kapingu, M. C., Miert, S., Claeys, M., Brun, R., Cos, P., Pieters, L., Vlietinck, A., **2004**. *Anthranoid compounds with antiprotozoal activity from *Vismia orientalis**. *Planta Medica*. 70, 706-710.
- McKenna, D. J., Towers, G. H., Abbott, F. S., **1984**. *Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants Part 2: Constituents of orally-active Myristicaceous hallucinogens*. *J. Ethnopharmacol.* 12, 179-211.
- Menne, B., **2006**. *Climate Change And Adaption Strategies for Human Health*. Springer.
- Mollinedo, S., Torrez, M., Holguin, E., Vargas, F., **2000**. *Leishmaniasis en Bolivia : X. Epidemiologia de fin de siglo* *Revista medica* 7.
- Monks, N. R., Bordignon, S. A. L., Ferraz, A., Machado, K. R., Faria, D. H., Lopes, R. M., Mondin, C. A., Souza, I. C. C., Lima, M. F. S., da Rocha, A. B., **2002**. *Anti-tumour Screening of Brazilian Plants*. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)* 40, 603-616.
- Monte Neto, R., Filho, J. M. B., Sousa, L. M. A., Filho, P. F. A., Dias, C. S., Oliveira, M. R., **2007**. *Crude Ethanolic Extract, Lignoid Fraction and Yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) Show Antileishmanial Activity*. *Journal of Biosciences*. 62, 348-352.
- Moraes, R. M., **2000**. *La estación Biológica de Tunquini: Un sitio favorable para entrenamiento e investigación biológica y ecológica de los bosques montanos de Bolivia*. *Ecología en Bolivia*. 35, 1-2.
- Morita, H., Nakayama, M., Kojima, H., Takeya, K., Itokawa, H., Schenkel, E. P., Motidome, M., **1991**. *Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 39, 693-697.
- Mundina, M., Vila, R., Tomi, F., Ciccio, J. F., Ibanez, C., Adzet, T., Casanova, J., Canigueral, S., **2000**. *Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica*. *Flavour and Fragrance Journal*. 15, 201-205.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., Kent, J., **2000**. *Biodiversity hotspots for conservation priorities*. *Nature*. 403, 853-858.
- Noyes, H. A., Reyburn, H., Bailey, J. W., Smith, D., **1998**. *A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan*. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 2877-2881.

- OPS/OMS, **2003**. *Ministerio de Salud y Prevision Social, Direccion General de Epidemiologia " Anuario Epidemiologico 2000"*. Organizacion Panamericana de la Salud. 24, 75-81.
- Osadebe, P. O., Okoye, F. B. C., **2003**. *Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of Alchornea cordifolia leaves*. Journal of Ethnopharmacology. 89, 19-24.
- Ouellette, M., Olivier, M., Sato, S., Papadopoulou, B., **2003**. *Le parasite Leishmania à l'ère de la post-génomique*. M/S: médecine sciences. 19, 900-909.
- Parimala Devi, B., Boominathan, R., Mandal, S. C., **2002**. *Evaluation of anti-diarrheal activity of Cleome viscosa L. extract in rats*. Phytomedicine(stuttgart). 9, 739-742.
- Password, F., **2003**. *An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II*. Botanical Journal of the Linnean Society. 141, 399-436.
- Pinto, M. C., Campbell-Lendrum, D. H., Lozovei, A. L., Teodoro, U., Davies, C. R., **2001**. *Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field*. Medical & Veterinary Entomology. 15, 132-139.
- Rezende, K. R., Davino, S. C., Barros, S. B. M., Kato, M. J., **2005**. *Antioxidant activity of aryltetralone lignans and derivatives from Virola sebifera (Aubl.)*. Natural Product Research. 19, 661-666.
- Rezende, K. R., Kato, M. J., **2002**. *Dibenzylbutane and aryltetralone lignans from seeds of Virola sebifera*. Phytochemistry. 61, 427-432.
- Ribera-Arismendi, M. O., **1995**. *Aspectos Ecológicos del uso de la tierra y conservación en el Parque Nacional y Área de Manejo Integrado Cotapata*. Caminos de Cotapata (C Morales, ed.). Instituto de Ecología, Fund-Eco, FONAMA-EIA. La Paz, Bolivia.
- Roberts, L. S., Janovy, J., Schmidt, G. D., 2000. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. McGraw-Hill.
- Roy, G., Dumas, C., Sereno, D., Wu, Y., Singh, A. K., Tremblay, M. J., Ouellette, M., Olivier, M., Papadopoulou, B., **2000**. *Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying Leishmania spp. infections in macrophages and in animal models*. Mol. Biochem. Parasitol. 110, 195-206.
- Saar, Y., Ransford, A., Waldman, E., Mazareb, S., Amin-Spector, S., Plumblee, J., Turco, S. J., Zilberstein, D., **1998**. *Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol. 95, 9-20.
- Sacks, D., Kamhawi, S., **2001**. *Molecular aspects of parasite-vector and vector -host interactions in leishmaniasis* Annual Review of Microbiology. 55, 453-483.
- Sacks, D. L., **1989**. *Metacyclogenesis in Leishmania promastigotes*. Exp. Parasitol. 69, 100-103.

- Salotra, P., Sreenivas, G., Pogue, G. P., Lee, N., Nakhasi, H. L., Ramesh, V., Negi, N. S., **2001**. *Development of a Species-Specific PCR Assay for Detection of Leishmania donovani in Clinical Samples from Patients with Kala-Azar and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis*. Journal of Clinical Microbiology. 39, 849-854.
- Sanchez, A., **2000**. *Servicio nacional de leishmaniasis Anuario Epidemiologico*.
- Schlein, Y., **1993**. *Leishmania and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission*. Parasitol Today. 9, 255-258.
- Sereno, D., Lemesre, J. L., **1997a**. *Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 41, 972-976.
- Sereno, D., Lemesre, J. L., **1997b**. *Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of Leishmania amazonensis in vitro*. Parasitology Research. 83, 401-403.
- Sereno, D., Roy, G., Lemesre, J. L., Papadopoulou, B., Ouellette, M., **2001**. *DNA Transformation of Leishmania infantum Axenic Amastigotes and Their Use in Drug Screening*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45, 1168-1173.
- SERNAP, **2001**. *Sistema nacional de áreas protegidas de Bolivia*. La Paz, Bolivia. 170-178.
- Setzer, W. N., Green, T. J., Whitaker, K. W., Moriarity, D. M., Yancey, C. A., Lawton, R. O., Bates, R. B., **1995**. *A cytotoxic diacetylene from Dendropanax arboreus*. Planta Med. 61, 470-471.
- Soto, J., Toledo, J., Valda, L., Balderrama, M., Rea, I., Parra, R., Ardiles, J., Soto, P., Gómez, A., Molleda, F., **2007**. *Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine*. Clin. Infect. Dis. 44, 350-356.
- Spichiger, R.-É., Savolainen, D., Jeanmonod, **2000**. *Botanique systématique des plantes à fleurs*. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- Stevens, P., **2001**. *Angiosperm phylogeny website*. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>.
- Sundar, S., **2001**. *Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis*. Tropical Medicine and International Health. 6, 849-854.
- Sundar, S., Reed, S. G., Singh, V. P., Kumar, P. C., Murray, H. W., **1998**. *Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis*. Lancet. 351, 563-565.
- Svarstad, H., Bugge, H. C., Dhillon, S. S., **2000**. *From Norway to Novartis: cyclosporin from Tolypocladium inflatum in an open access bioprospecting regime*. Biodiversity and Conservation. 9, 1521-1541.
- Takeda, Y., Yamashita, H., Matsumoto, T., Terao, H., **1993**. *Chloranthalactone F, a sesquiterpenoid from the leaves of Chloranthus glaber*. Phytochemistry. 33, 713-715.

- Thakur, C. P., Sinha, G. P., Pandey, A. K., **1996**. *Comparison of regimens of amphotericin B deoxycholate in kala-azar*. Indian J. Med. Res. 103, 259-263.
- Tiuman, T. S., Ueda-Nakamura, T., Garcia Cortez, D. A., Dias Filho, B. P., Morgado-Diaz, J. A., de Souza, W., Nakamura, C. V., **2005**. *Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from Tanacetum parthenium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49, 176-182.
- Todzia, C. A., **1988**. *Chloranthaceae: Hedyosmum*. Flora Neotrop. Monogr. 48, 1-139.
- Todzia, C. A., **1993**. *New Species of Hedyosmum (Chloranthaceae) from Northern South America*. Novon. 3, 81-85.
- Trager, W., Jensen, J. B., **1976**. *Human malaria parasites in continuous culture*. Science. 193, 673-675.
- Trentin, A. P., Santos, A. R. S., Guedes, A., Pizzolatti, M. G., Yunes, R. A., Calixto, J. B., **1999**. *Antinociception Caused by the Extract of Hedyosmum brasiliense and its Active Principle, the Sesquiterpene Lactone 13-Hydroxy-8, 9-dehydroshizukanolide*. Planta Medica. 65, 517-521.
- Tsui, W. Y., Brown, G. D., **1996**. *Cycloedesmanolides from Sarcandra glabra*. Phytochemistry. 43, 819-821.
- Valente, C., Ferreira, M. J. U., Abreu, P. M., Gyemant, N., Ugocsai, K., Hohmann, J., Molnar, J., **2004a**. *Pubescenes, jatrophone diterpenes, from Euphorbia pubescens, with multidrug resistance reversing activity on mouse lymphoma cells*. Planta Medica. 70, 81-84.
- Valente, C., Ferreira, M. J. U., Abreu, P. M., Pedro, M., Cerqueira, F., Nascimento, M. S. J., **2003**. *Three new jatrophone-type diterpenes from Euphorbia pubescens*. Planta Medica. 69, 361-366.
- Valente, C., Pedro, M., Ascenso, J. R., Abreu, P. M., Nascimento, M. S. J., Ferreira, M. J. U., **2004b**. *Euphopubescenol and euphopubescene, two new jatrophone polyesters, and lathyrane-type diterpenes from Euphorbia pubescens*. Planta Medica. 70, 244-249.
- Valente, C., Pedro, M., Duarte, A., Nascimento, M. S. J., Abreu, P. M., Ferreira, M. J. U., **2004c**. *Bioactive diterpenoids, a new jatrophone and two ent-abietanes, and other constituents from Euphorbia pubescens*. Journal of Natural Products. 67, 902-904.
- Valentin, A., Benoit-Vical, F., Moulis, C., Stanislas, E., Mallie, M., Fouraste, I., Bastide, J. M., **1997**. *In vitro antimalarial activity of penduline, a bisbenzylisoquinoline from Isopyrum thalictroides*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 41, 2305-2307.
- Vannier-Santos, M. A., Martiny, A., de Souza, W., **2002**. *Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading*. Curr. Pharm. Des. 8, 297-318.

- Vecchiotti, V., Casagrande, C., Ferrari, G., Severini Ricca, G., **1979**. *New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum**. *Farmaco [Sci]* 34, 829-840.
- Von Rotz, R., Cuca, L., Martinez, J. C., **1990**. *Diarylpropanes and indole derivative in trunk wood of *Virola sebifera* and *V. calophylloidea**. *Revista Colombiana de Quimica*. 19, 97-100.
- Wang, C. C., Chen, L. G., Yang, L. L., **2002**. *Cytotoxic Activity of Sesquiterpenoids from *Atractylodes ovata* on Leukemia Cell Lines*. *Planta Medica*. 68, 204-208.
- Wasunna, M. K., Rashid, J. R., Mbui, J., Kirigi, G., Kinoti, D., Lodenyo, H., Felton, J. M., Sabin, A. J., Horton, J., **2005**. *A Phase II Dose-Increasing Study of Sitamaquine for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Kenya*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 73, 871-876.
- WHO, **2002**. [htt://www.who.int/](http://www.who.int/).
- WHO, **2000**. *Rapport sur la santé dans le monde Archives*. 1995-2000, Genève.
- Williams, L. A. D., Vasques, E., Reid, W., Porter, R., Kraus, W., **2003**. *Biological activities of an extract from *Cleome viscosa* L.(Capparaceae)*. *Naturwissenschaften*. 90, 468-472.
- Wu, B., He, S., Pan, Y., **2007**. *Sesquiterpenoid with new skeleton from *Chloranthus henryi**. *Tetrahedron letters*. 48, 453-456.
- Yang, S. P., Gao, Z. B., Wang, F. D., Liao, S. G., Chen, H. D., Zhang, C. R., Hu, G. Y., Yue, J. M., **2007**. *Chlorahololides A and B, Two Potent and Selective Blockers of the Potassium Channel Isolated from *Chloranthus holostegius**. *Org. Lett.* 9, 903-906.
- Yang, S. P., Yue, J. M., **2006**. *Chloramultilide A, a highly complex sesquiterpenoid dimmer from *Chloranthus multistachys**. *Tetrahedron letters*. 47.
- Zhang, S., Won, Y. K., Ong, C. N., Shen, H. M., **2005**. *Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms*. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents*. 5, 239-249.

VII. Annexes

Famille	Espèces	Fréquence Parcelle 1581 m	Fréquence Parcelle 1660 m	Fréquence Parcelle 1720 m	Fréquence Parcelle 2000 m	Fréquence Parcelle 2365 m	Fréquence Parcelle 2729 m	Fréquence totale	Nombre d'articles publiés sur l'espèce en chimie ou pharmacologie
Actinidaceae	<i>Saurauia spectabilis</i>	1						1	0
Alzateaceae	<i>Alzatea verticillata</i>			3				3	1
Anacardiaceae	<i>Tapirira guianensis</i>		1	2	3			6	5
Annonaceae	<i>Guatteria lasiocalyx</i>	1	4	1	5			11	0
Annonaceae	<i>Guatteria sp.</i>				1			1	
Annonaceae	<i>Guatteria sp.</i>				1			1	
Araliaceae	<i>Dendropanax arboreus</i>				1				4
Araliaceae	<i>Dendropanax sp.</i>				1			1	
Araliaceae	<i>Dendropanax sp.</i>				1			1	
Araliaceae	<i>Oreopanax sp</i>	1						1	
Araliaceae	<i>Oreopanax sp</i>				1			1	
Araliaceae	<i>Schefflera cf. bangii</i>		1					1	0
Asteraceae	<i>Baccharis buchtienii</i>					1		1	0
Asteraceae	<i>Vernonanthura patens</i>	1				7		8	0
Boraginaceae	<i>Cordia sp</i>		1					1	
Burseraceae	<i>Protium cf meridionale</i>				1			1	0
Burseraceae	<i>Protium montanum</i>		7	1				8	0
Burseraceae	<i>Protium sp.</i>				1			1	
Chloranthaceae	<i>Hedyosmum angustifolium</i>	3				1		4	1
Chloranthaceae	<i>Hedyosmum dombeyanum</i>						1	1	0
Chloranthaceae	<i>Hedyosmum racemosum</i>			14		1	5	20	0
Chrysobalanaceae	<i>Hirtella sp.</i>	1						1	0
Clethraceae	<i>Clethra revoluta</i>					11		11	0
Clethraceae	<i>Clethra scabra var. laevigata</i>					1		1	0
Clethraceae	<i>Clethra sp.</i>					1		1	
Clethraceae	<i>Clethra sp.</i>					1		1	
Clethraceae	<i>Clethra sp.</i>					1		1	
Clethraceae	<i>Clethra sp.</i>					1		1	
Clethraceae	<i>Clethra sp.</i>					1		1	
Clethraceae	<i>Clethra sp.</i>					1		1	
Clethraceae	<i>Clethra sp.</i>					1		1	
Clethraceae	<i>Clethra sp.</i>					1		1	
Cunoniaceae	<i>Weinmannia cf. dryadifolia</i>						1	1	0

Cunoniaceae	<i>Weinmannia lechleriana</i>		1		1			2	0
Cunoniaceae	<i>Weinmannia microphylla</i>						4	4	0
Cunoniaceae	<i>Weinmannia pinnata</i>			2				2	0
Cyatheaceae	<i>Alsophila erinacea</i>	5						5	0
Cyatheaceae	<i>Cyathea caracasana</i>	3		3		2		8	0
Cyatheaceae	<i>Cyathea conjugata</i>					3		3	0
Cyatheaceae	<i>Cyathea delgadii</i>						11	11	0
Cyatheaceae	<i>Cyathea sp.</i>	1						1	
Cyatheaceae	<i>Cyathea sp.</i>						1	1	
Elaeocarpaceae	<i>Sloanea gracilis</i>			1				1	0
Ericaceae	<i>Cavendishia bracteata</i>					2		2	0
Euphorbiaceae	<i>Acalypha sp.</i>	1						1	
Euphorbiaceae	<i>Acalypha sp.</i>	1						1	
Euphorbiaceae	<i>Alchornea glandulosa</i>	5	1		4			10	3
Euphorbiaceae	<i>Alchornea aff. pearcei</i>					3	6	9	0
Euphorbiaceae	<i>Alchornea pubescens</i>			1	3			4	4
Euphorbiaceae	<i>Alchornea triplinervia</i>			8				8	3
Euphorbiaceae	<i>Hyeronima alchornoides</i>	5			1			6	2
Euphorbiaceae	<i>Hyeronima moritziana</i>				2			2	0
Euphorbiaceae	<i>Mabea sp.</i>		1					1	
Euphorbiaceae	<i>Mabea sp.</i>		1					1	
Euphorbiaceae	<i>Mabea sp.</i>		1					1	
Euphorbiaceae	<i>Mabea sp.</i>			1				1	
Flacourtiaceae	<i>Casearia sp.</i>				1			1	
Guttiferae	<i>Clusia aff. flaviflora</i>						4	4	0
Guttiferae	<i>Clusia sp.</i>		1					1	
Guttiferae	<i>Clusia sp.</i>		1					1	
Guttiferae	<i>Clusia sp.</i>			1				1	
Guttiferae	<i>Clusia sp.</i>			1				1	
Guttiferae	<i>Clusia sp.</i>						1	1	
Guttiferae	<i>Havetropsis sp.</i>					1		1	
Guttiferae	<i>Vismia glaziovii</i>			1				1	0
Guttiferae	<i>Vismia pozusoensis</i>				1			1	0
Guttiferae	<i>Vismia sp.</i>					1		1	
Lauraceae	<i>Nectandra cissiflora</i>				6			6	0
Lauraceae	<i>Nectandra reticulata</i>	1		2			1	4	0
Lauraceae	<i>Nectandra turbacensis</i>		1		5			6	1

Lauraceae	<i>Nectandra sp.</i>			1				1	
Lauraceae	<i>Nectandra sp.</i>						1	1	
Lauraceae	<i>Ocotea aff. jelskii</i>						2	2	0
Lauraceae	<i>Ocotea sp.</i>	1						1	
Lauraceae	<i>Ocotea sp.</i>			1				1	
Lauraceae	<i>Ocotea sp.</i>			1				1	
Lauraceae	<i>Ocotea sp.</i>			1				1	
Lauraceae	<i>Ocotea sp.</i>			1				1	
Lauraceae	<i>Ocotea sp.</i>			1				1	
Lauraceae	<i>Ocotea sp.</i>			1				1	
Lauraceae	<i>Ocotea sp.</i>					1		1	
Lauraceae	<i>Ocotea sp.</i>					1		1	
Lauraceae	<i>Persea sp.</i>			1				1	
Lauraceae			1					1	
Lauraceae			1					1	
Lauraceae				1				1	
Lauraceae				1				1	
Lauraceae				1				1	
Lauraceae				1				1	
Lauraceae				1				1	
Lauraceae				1				1	
Lauraceae				1				1	
Lauraceae				1				1	
Lauraceae				1				1	
Lauraceae				1				1	
Lauraceae						1		1	
Lauraceae						1		1	
Lauraceae						1		1	
Lauraceae						1		1	
Lauraceae						1		1	
Lauraceae						1		1	
Lauraceae							1	1	
Leg-Mimosaceae	<i>Inga acreana</i>	1						1	1
Leg-Mimosaceae	<i>Inga marginata</i>	1						1	1
Leg-Mimosaceae	<i>Inga multijuga spp. Multijuga</i>					1		1	0
Leg-Mimosaceae	<i>Inga nobilis</i>					1		1	0
Leg-Mimosaceae	<i>Inga umbellifera</i>		1					1	2
Leg-Papilionaceae	<i>Abarema aff. centriflora</i>					1		1	0
Loranthaceae	<i>Gaiadendron puntatum</i>						1	1	1
Melastomataceae	<i>Graffenrieda boliviensis</i>			4				4	0

Melastomataceae	<i>Meriania aff. axinaeoides</i>	1	8	1				10	0 ?
Melastomataceae	<i>Meriania sp.</i>	1						1	
Melastomataceae	<i>Meriania sp.</i>		1					1	
Melastomataceae	<i>Meriania sp.</i>		1					1	
Melastomataceae	<i>Meriania sp.</i>		1					1	
Melastomataceae	<i>Miconia affinis</i>	2			10			12	0
Melastomataceae	<i>Miconia calvescens</i>	1			1			2	0
Melastomataceae	<i>Miconia elongata</i>					4		4	0
Melastomataceae	<i>Miconia punctata</i>		7					7	0
Melastomataceae	<i>Miconia theaezans</i>		2		1		2	5	0
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>	1						1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>			1				1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>			1				1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>				1			1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>					1		1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>					1		1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>					1		1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>					1		1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>					1		1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>					1		1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>						1	1	
Melastomataceae	<i>Miconia sp.</i>						1	1	
Melastomataceae	<i>Tibouchina bicolor</i>					24		24	0
Melastomataceae			1					1	
Melastomataceae					1			1	
Monimiaceae	<i>Mollinedia aff. killipii</i>		4					4	0
Monimiaceae	<i>Siparuna decipiens</i>		1					1	0 ?
Moraceae	<i>Cecropia angustifolia</i>					2		2	0
Moraceae	<i>Cecropia sp.</i>	1						1	
Moraceae	<i>Helicostylis tovarensis</i>		2	1	2			5	0
Moraceae	<i>Pouroma minor</i>		1					1	0 ?
Myricaceae	<i>Myrica pubescens</i>					5		5	0 ?
Myristicaceae	<i>Virola peruviana</i>		2					2	2
Myristicaceae	<i>Virola sebifera</i>		3	1				4	17
Myrsinaceae	<i>Geissanthus sp.</i>			1				1	
Myrsinaceae	<i>Myrsine coriacea</i>					2	4	6	1

Myrsinaceae	<i>Myrsine sp.</i>						1	1	
Myrsinaceae	<i>Myrsine sp.</i>						1	1	
Myrtaceae	<i>Myrcia sp.</i>		1					1	
Myrtaceae	<i>Myrcia sp.</i>			1				1	
Myrtaceae	<i>Myrcia sp.</i>				1			1	
Myrtaceae	<i>Myrcia sp.</i>						1	1	
Nyctaginaceae	<i>Neea buchtienii</i>				1			1	0 ?
Podocarpaceae	<i>Podocarpus rusbyi</i>			1			6	7	0
Rosaceae	<i>Prunus aff. tucumanensis</i>				1			1	0
Rubiaceae	<i>Bathysa obovata</i>	2	3					5	0
Rubiaceae	<i>Cinchona calisaya</i>						1	1	3
Rubiaceae	<i>Cinchona pubescens</i>		1		1			2	3
Rubiaceae	<i>Elaeagia cf. marieae</i>		4		3			7	0 ?
Rubiaceae	<i>Elaeagia sp.</i>	1						1	
Rubiaceae	<i>Elaeagia sp.</i>		1					1	
Rubiaceae	<i>Faramea bangii</i>	1						1	0
Rubiaceae	<i>Faramea candelabrum</i>		6	2	1			9	0
Rubiaceae	<i>Guettarda sabiceodes</i>	7						7	0
Rubiaceae	<i>Guettarda tournefortiopsis</i>					2		2	0
Rubiaceae	<i>Ladenbergia cf. bullata</i>			3				3	0
Rubiaceae	<i>Palicourea sp.</i>						1	1	
Rubiaceae	<i>Palicourea sp.</i>						1	1	
Rubiaceae	<i>Psychotria coneophoroides</i>				6			6	0
Rubiaceae	<i>Psychotria tinctoria</i>	9						9	0
Rubiaceae	<i>Psychotria cf. tristis</i>				1			1	0 ?
Rubiaceae	<i>Psychotria sp.</i>						1	1	
Rubiaceae	<i>Psychotria sp.</i>						1	1	
Rubiaceae	<i>Rudgea sp.</i>				1			1	
Rubiaceae	<i>Rudgea sp.</i>				1			1	
Rubiaceae	<i>Rudgea sp.</i>				1			1	
Rubiaceae	<i>Rudgea sp.</i>				1			1	
Rubiaceae		1						1	
Rubiaceae			1					1	
Rubiaceae					1			1	
Sabiaceae	<i>Meliosma sp.</i>				1			1	
Sabiaceae	<i>Meliosma sp.</i>					1		1	
Sapindaceae	<i>Guarea sp.</i>		1					1	

Sapindaceae	<i>Matayba sp.</i>				1			1	
Sapotaceae	<i>Pouteria caimito</i>	1						1	3
Saxifragaceae	<i>Escallonia paniculata</i>					16		16	0
Solanaceae	<i>Solanum sp.</i>				1			1	
Solanaceae	<i>Solanum sp.</i>				1			1	
Symplocaceae	<i>Symplocus aff. globulifera</i>	1						1	0
Symplocaceae	<i>Symplocus sp.</i>		1					1	
Theaceae	<i>Ternstroemia aff. polyandra</i>							1	0
Theaceae					1			1	
Theaceae					1			1	
Theaceae					1			1	
Theaceae							1	1	
Theaceae							1	1	
Vochysiaceae	<i>Vochysia sp</i>	1						1	
Vochysiaceae	<i>Vochysia sp</i>		1					1	

Tableau 47.- Distribution altitudinal des familles, des espèces et des individus dans les six parcelles et les nombres de publications existantes pour chaque espèce sur des études chimiques ou pharmacochimiques.

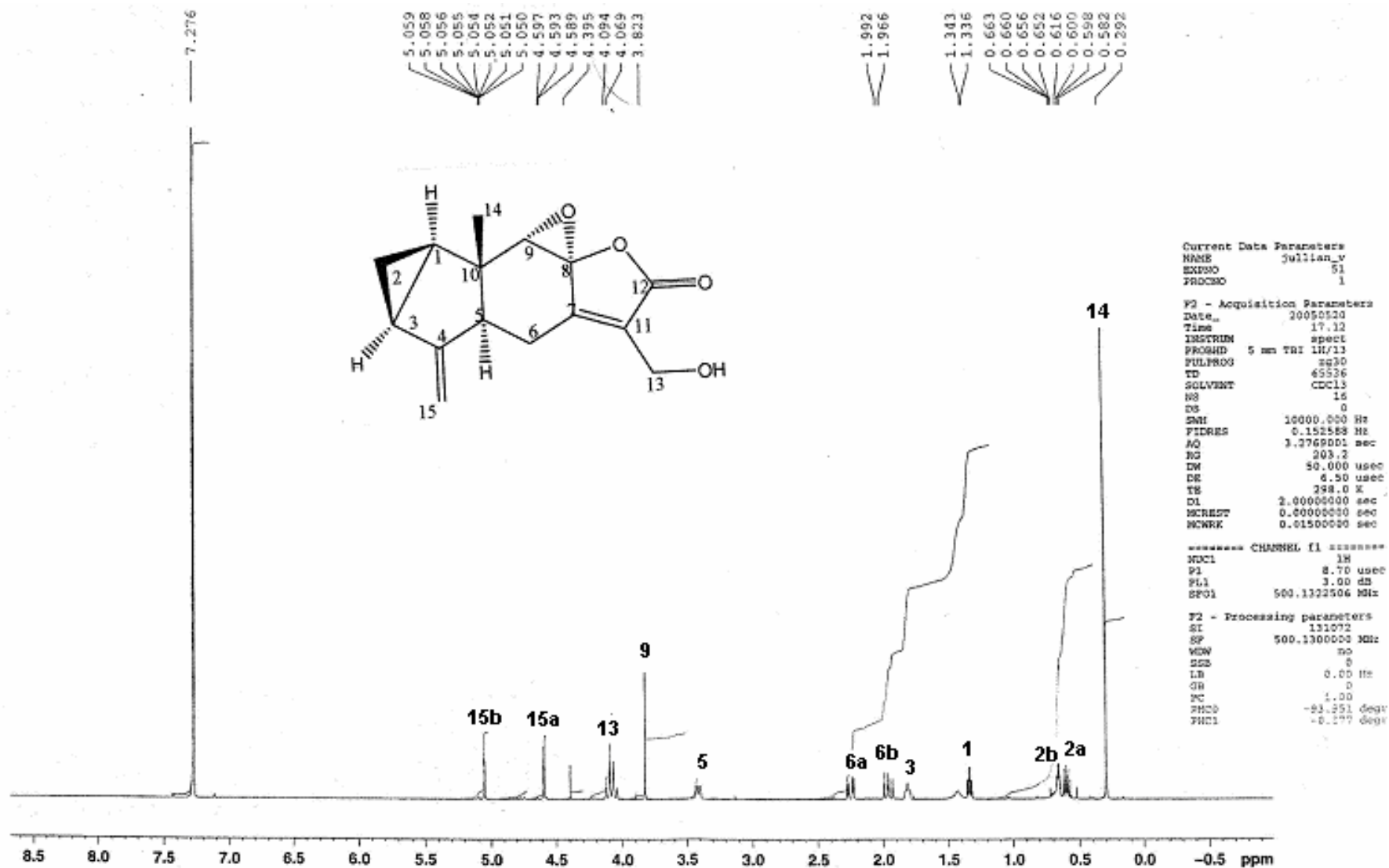
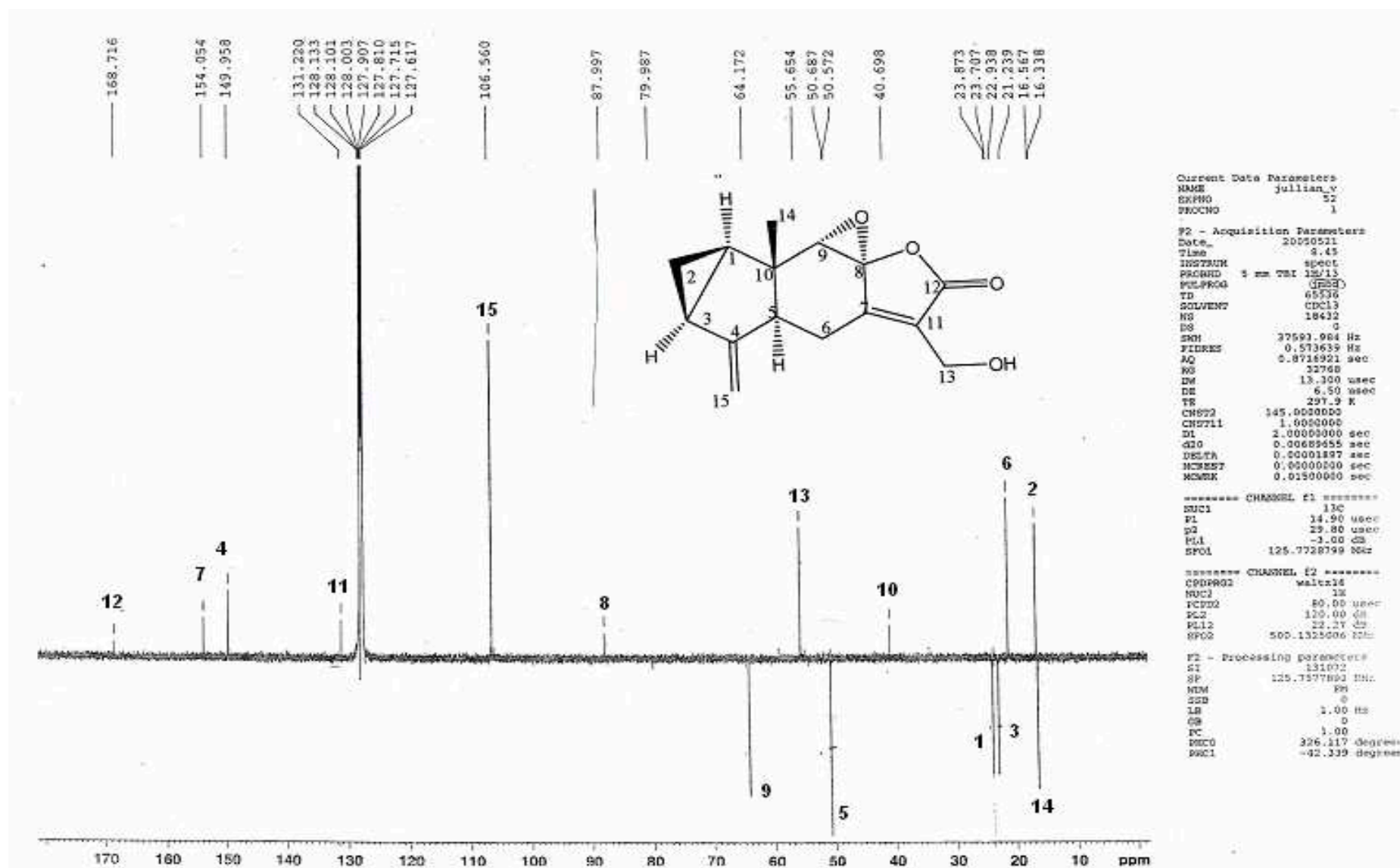


Figure 88.- Spectre RMN ^1H de l'oxynosérialide (M2) dans le C_6D_6 (500 MHz)



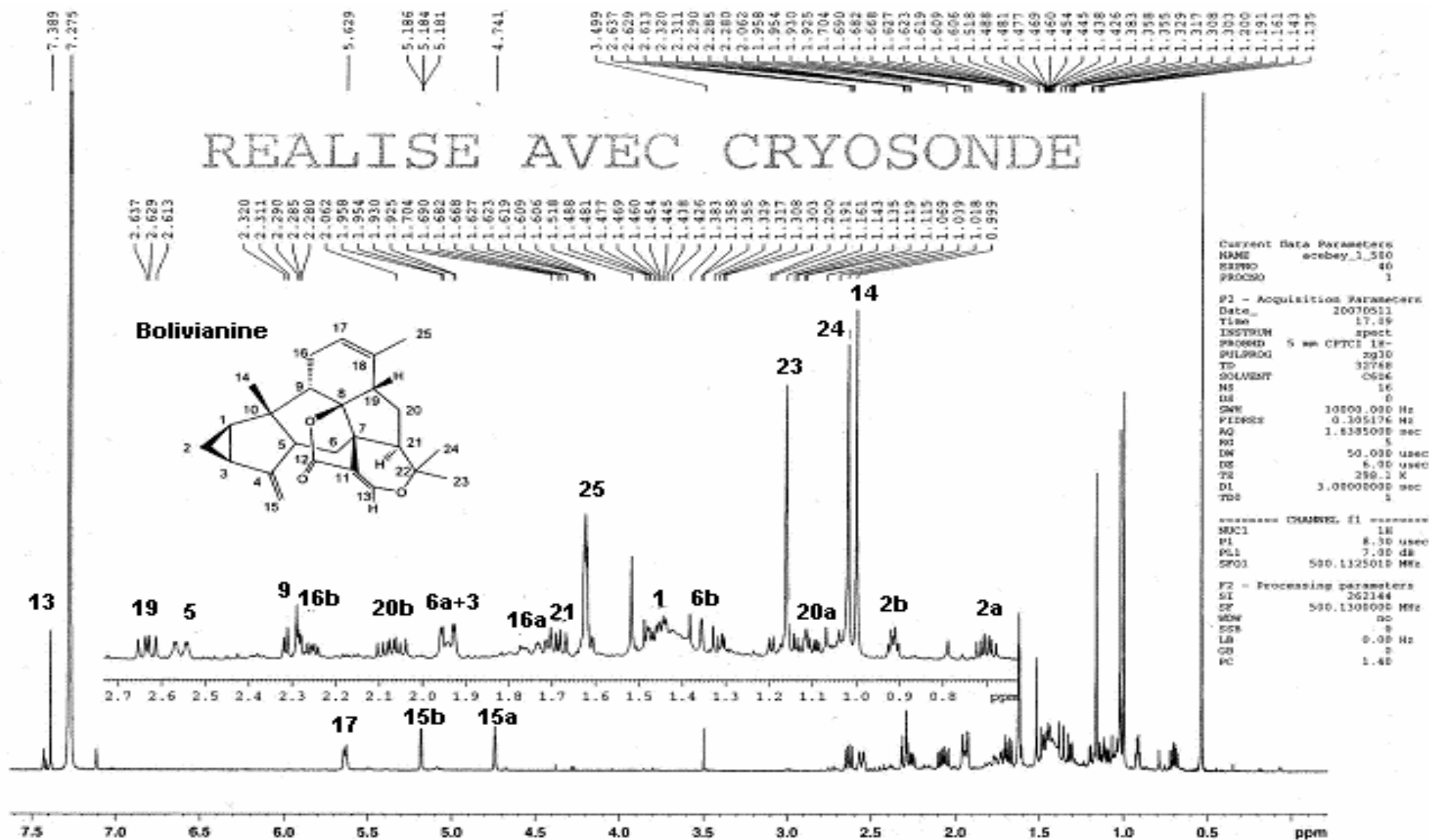


Figure 90.- Spectre RMN ¹H de la bolivianine (M5) dans le C₆D₆ (500 MHz)

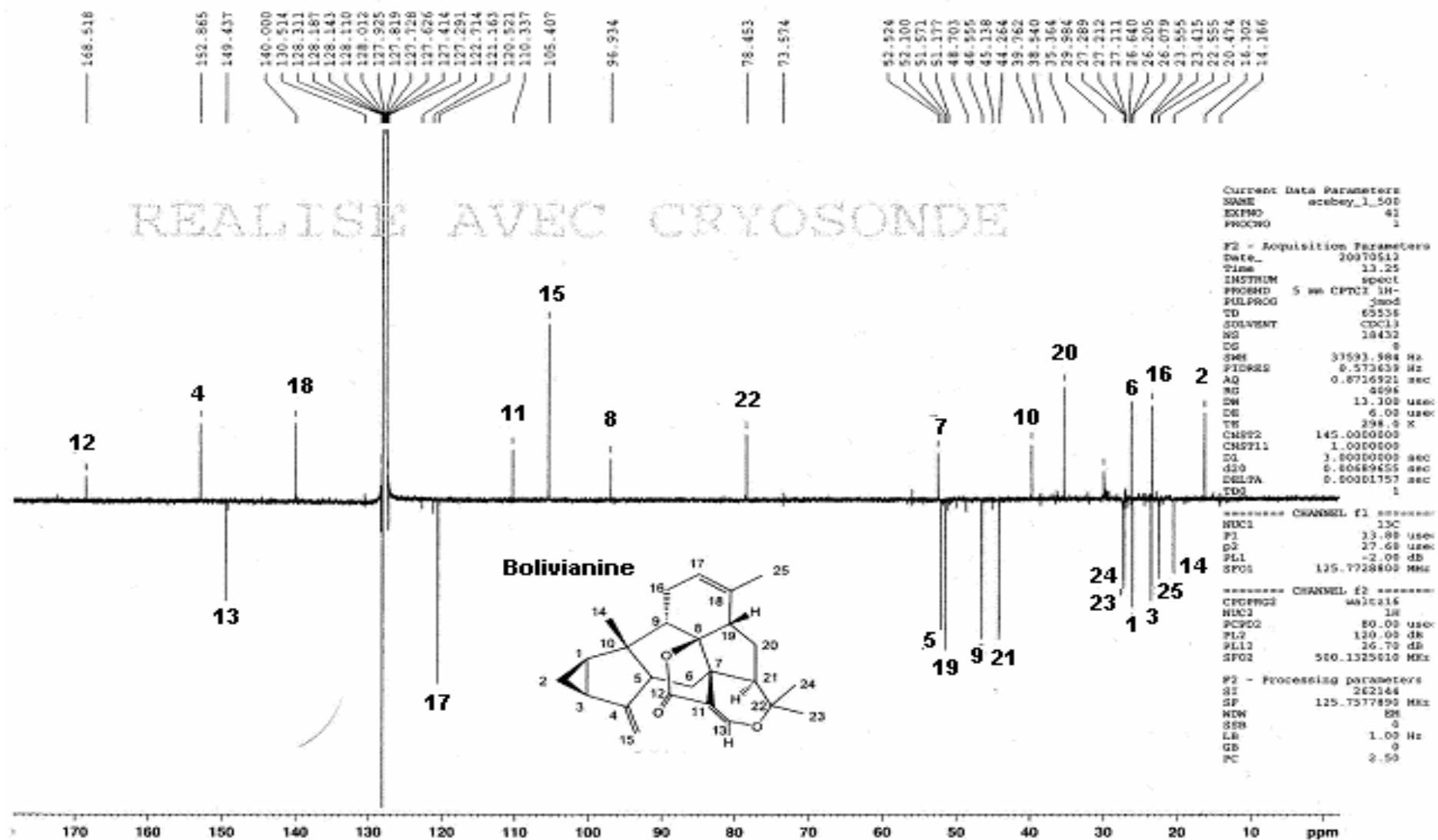
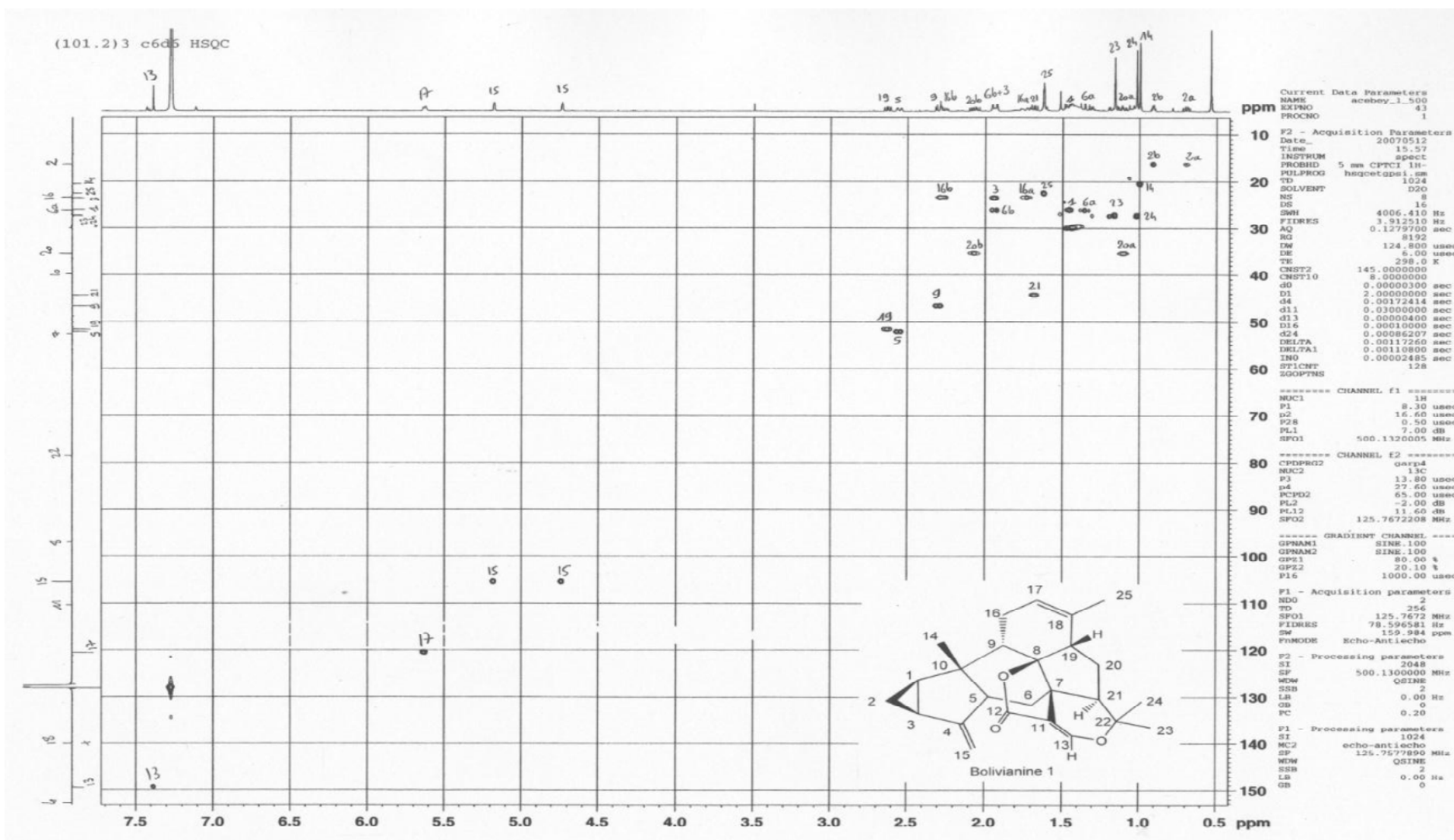


Figure 91.- Spectre RMN ^{13}C de la bolivianine (M5) dans le C_6D_6 (125 MHz)

Figure 92.- Spectre HSQC de la bolivianine (M5) dans le C₆D₆

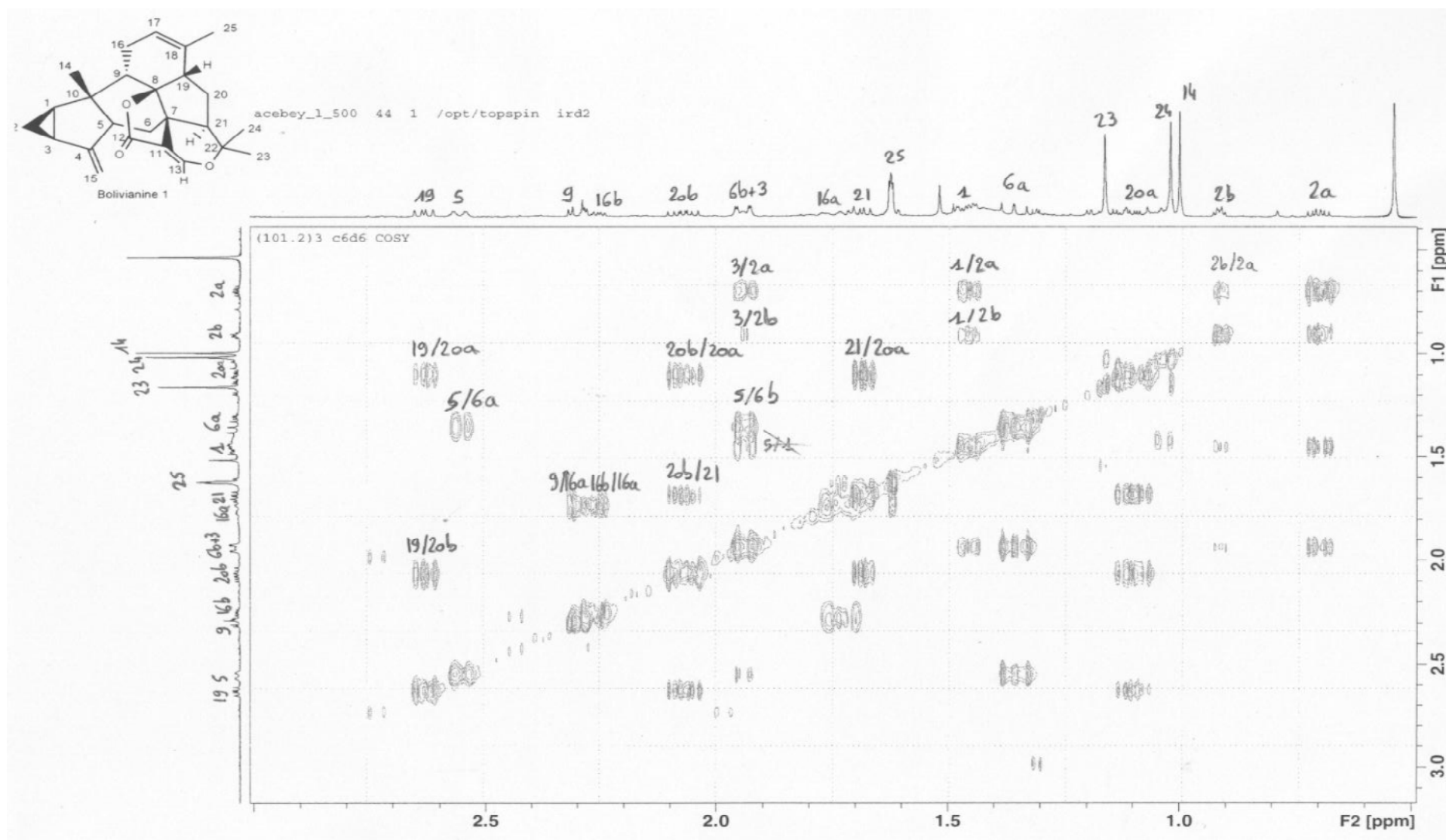


Figure 93.- Spectre COSY de la bolivianine (M5) dans le C_6D_6 (Elargissement)

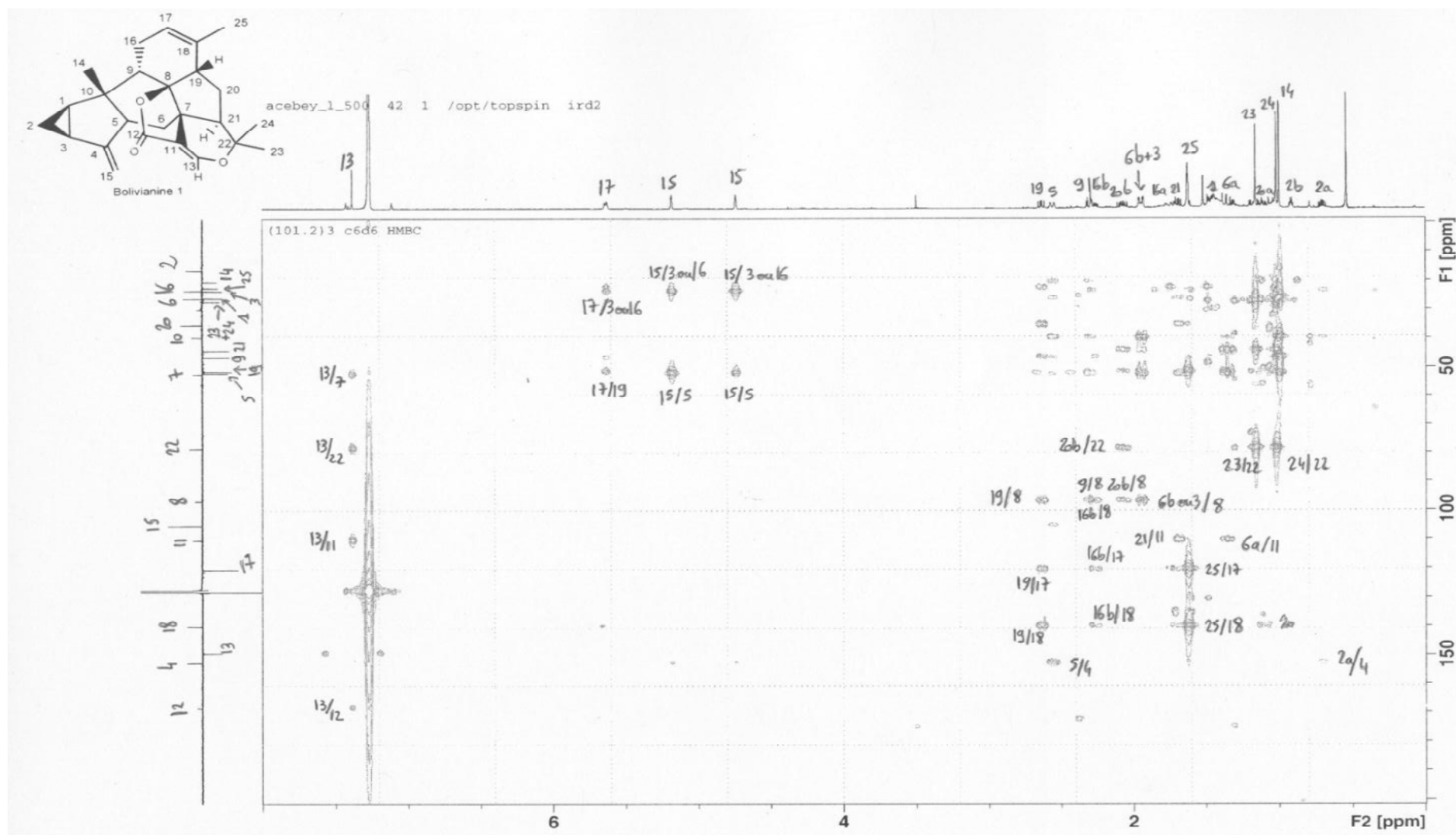


Figure 94.- Spectre HMBC de la bolivianine (M5) dans le C_6D_6

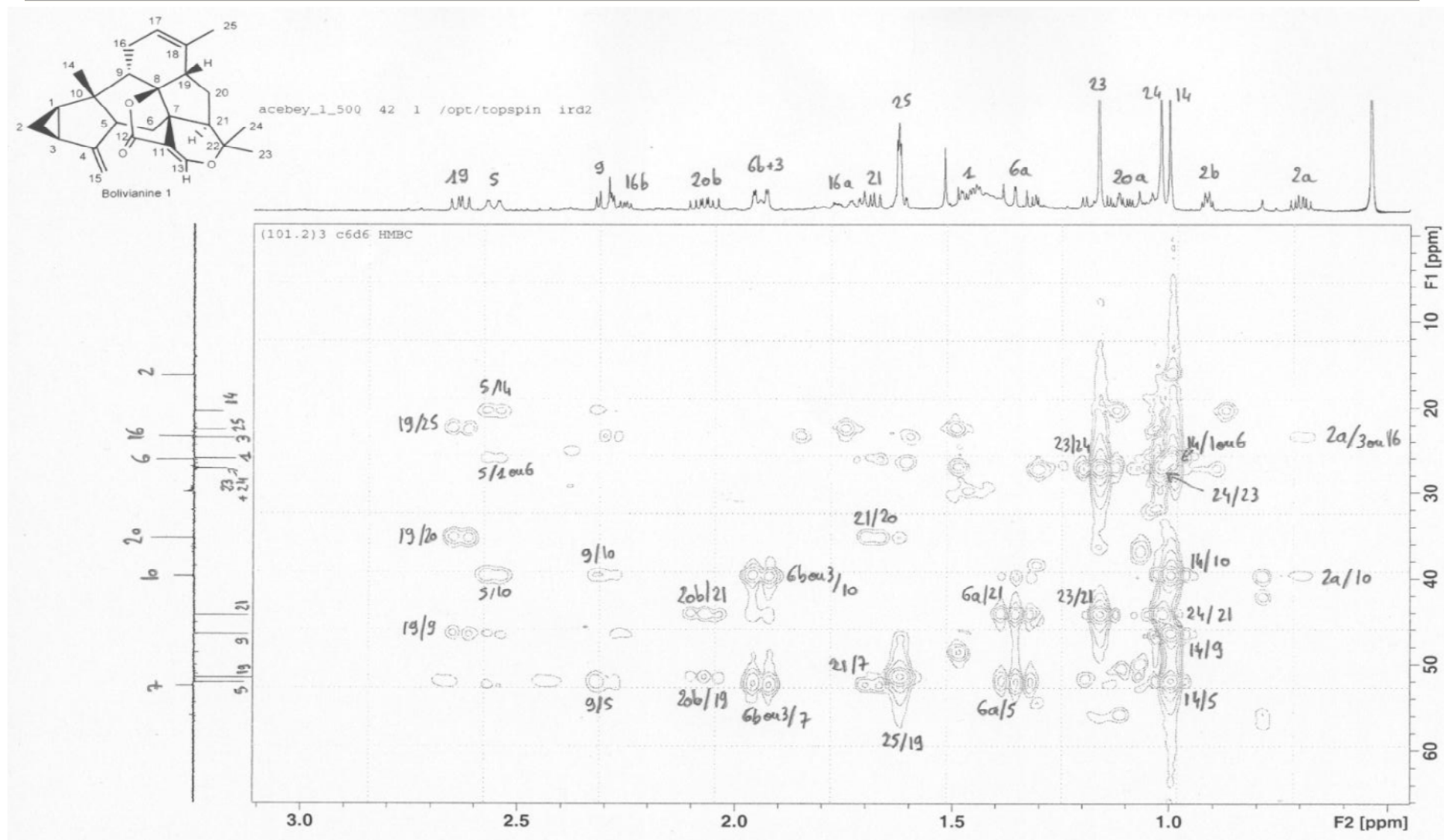


Figure 95.- Spectre HMBC de la bolivianine (M5) dans le C_6D_6 (Elargissement)

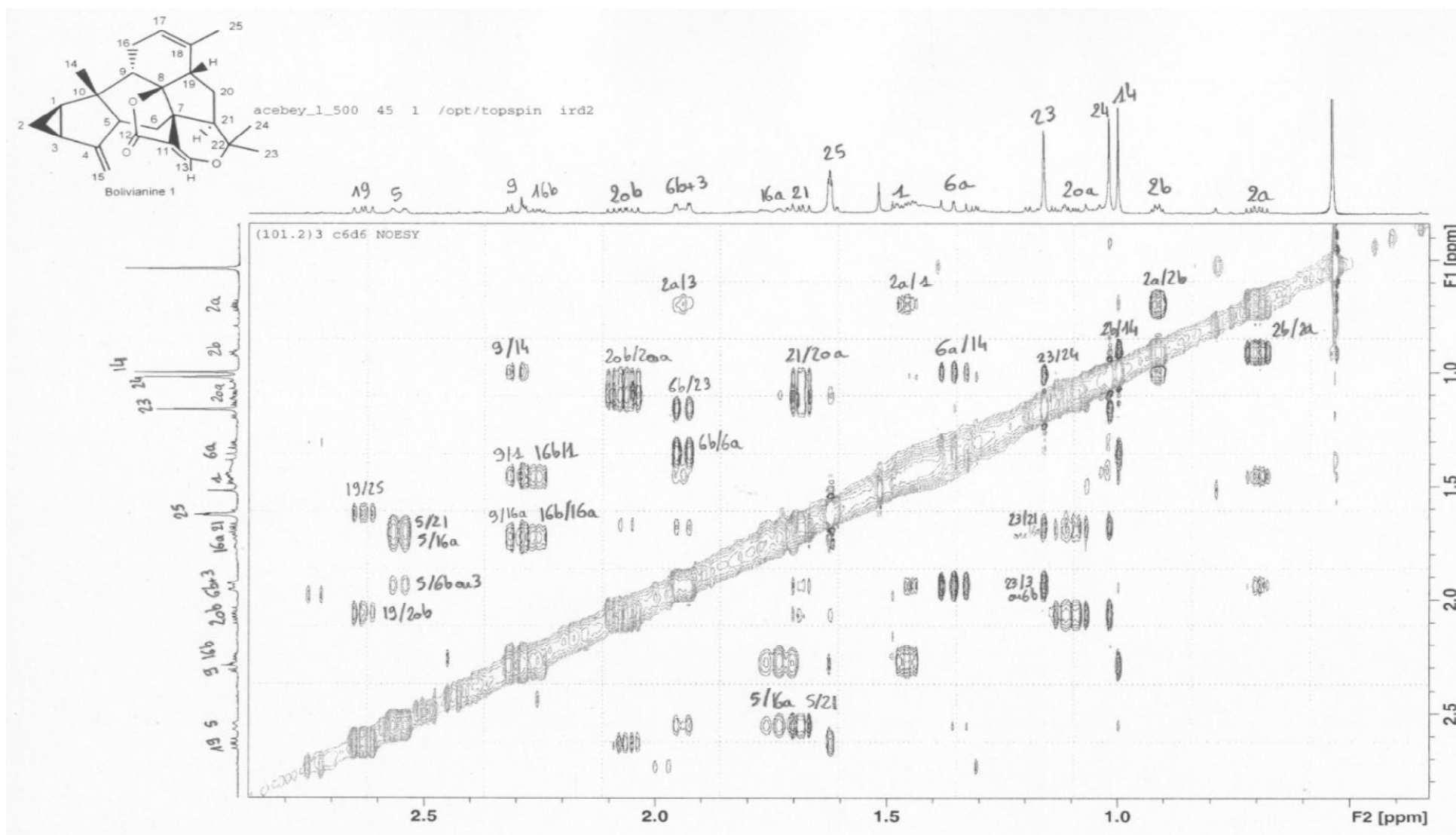


Figure 96.- Spectre NOESY de la bolivianine (M5) dans le C_6D_6 (Elargissement)

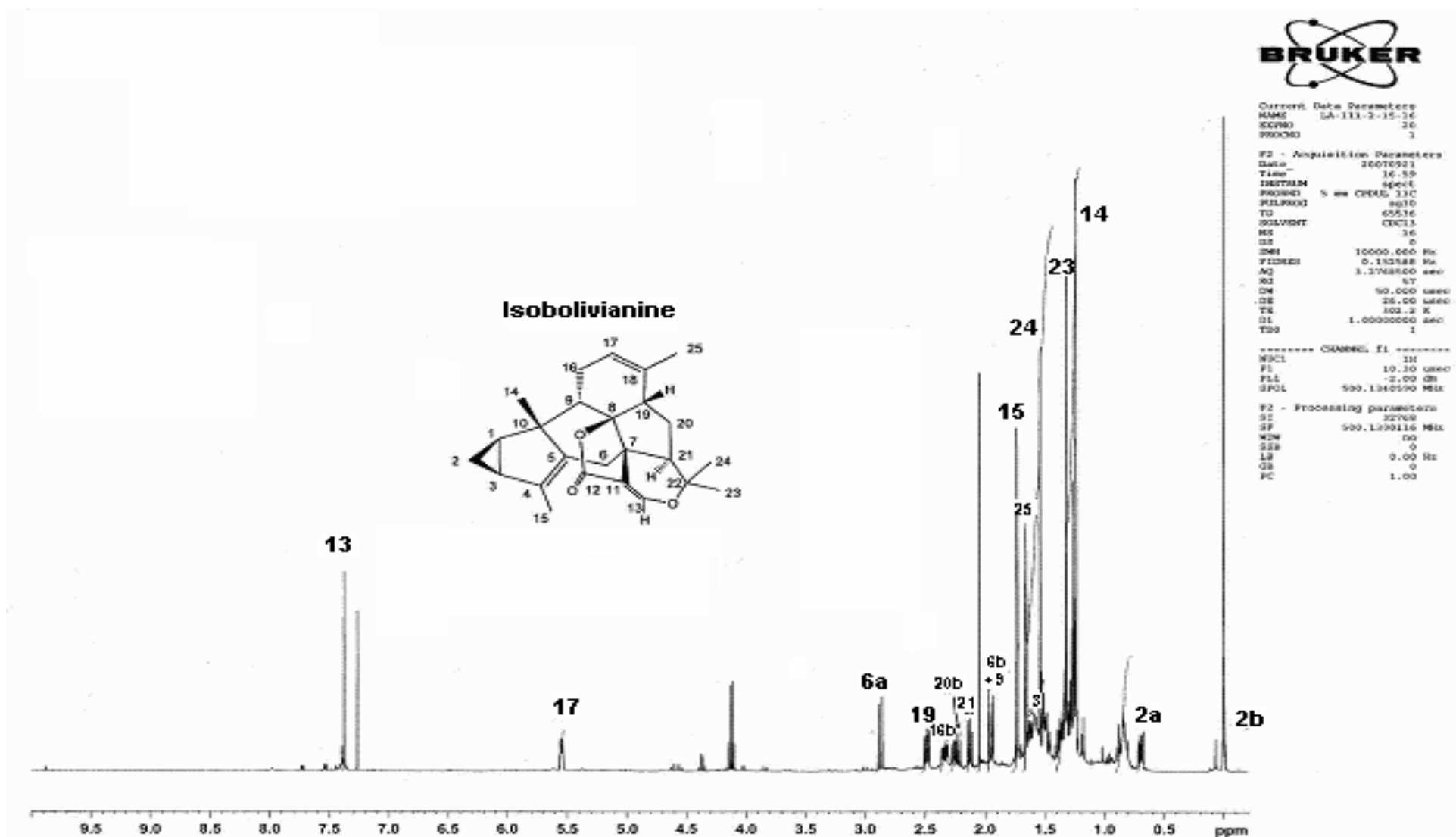


Figure 97.- Spectre RMN ^1H de l'isobolivianine (M6) dans le CDCl_3 (500 MHz)

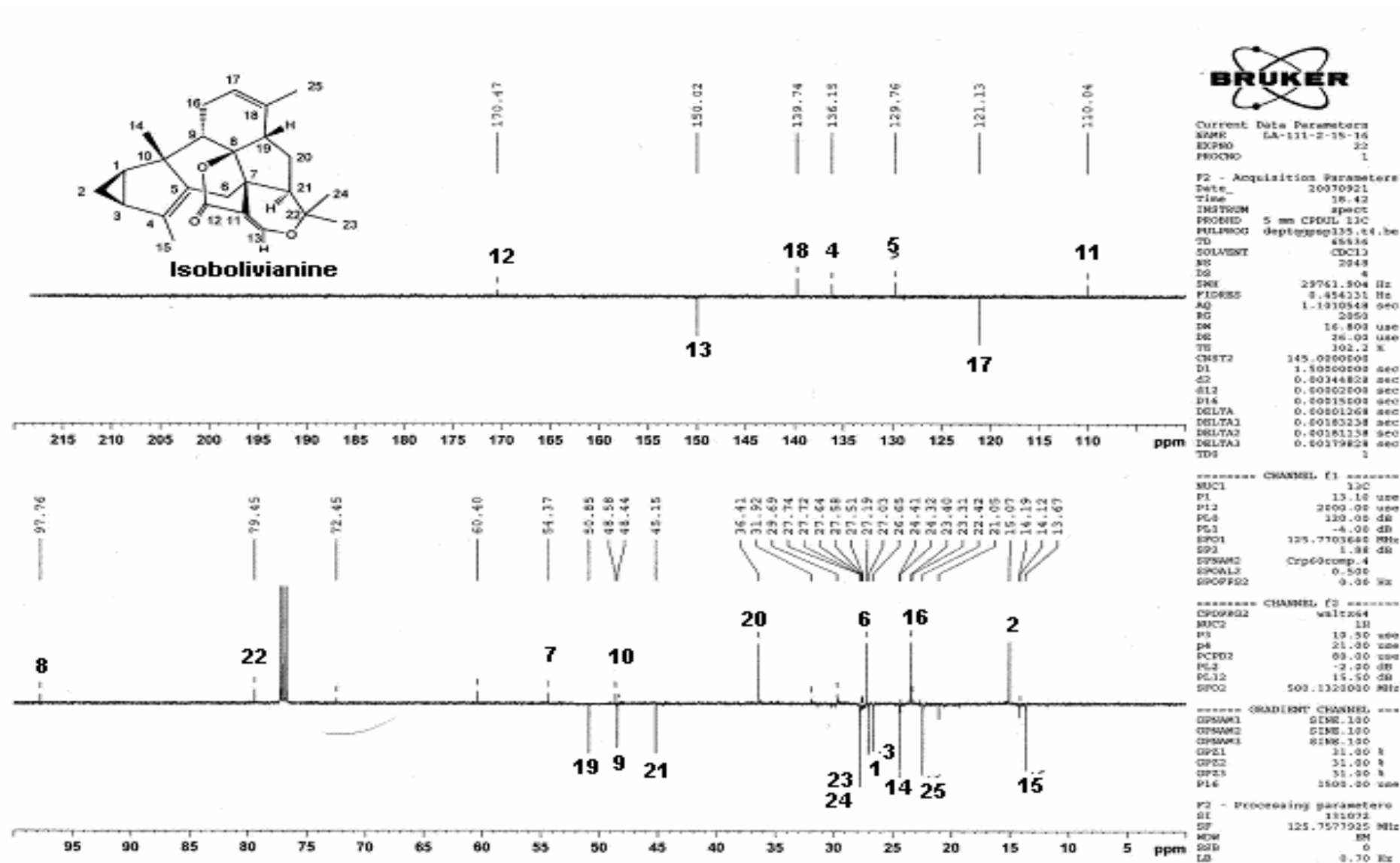


Figure 98.- Spectre RMN ^{13}C de l'isobolivianine (M6) dans le CDCl_3 (125 MHz)

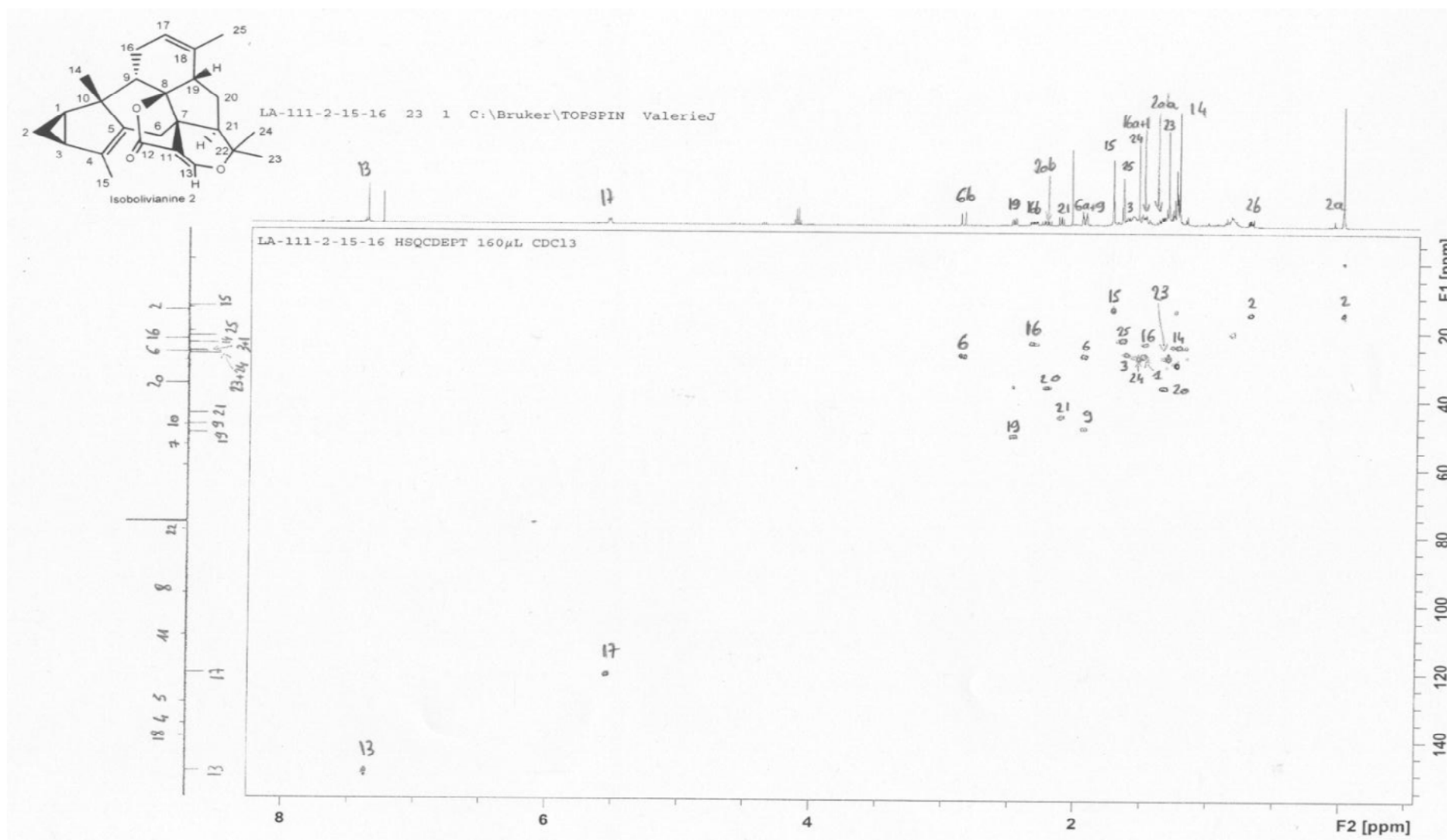


Figure 99.- Spectre RMN HSQC de l'isobolivianine (M6) dans le CDCl₃

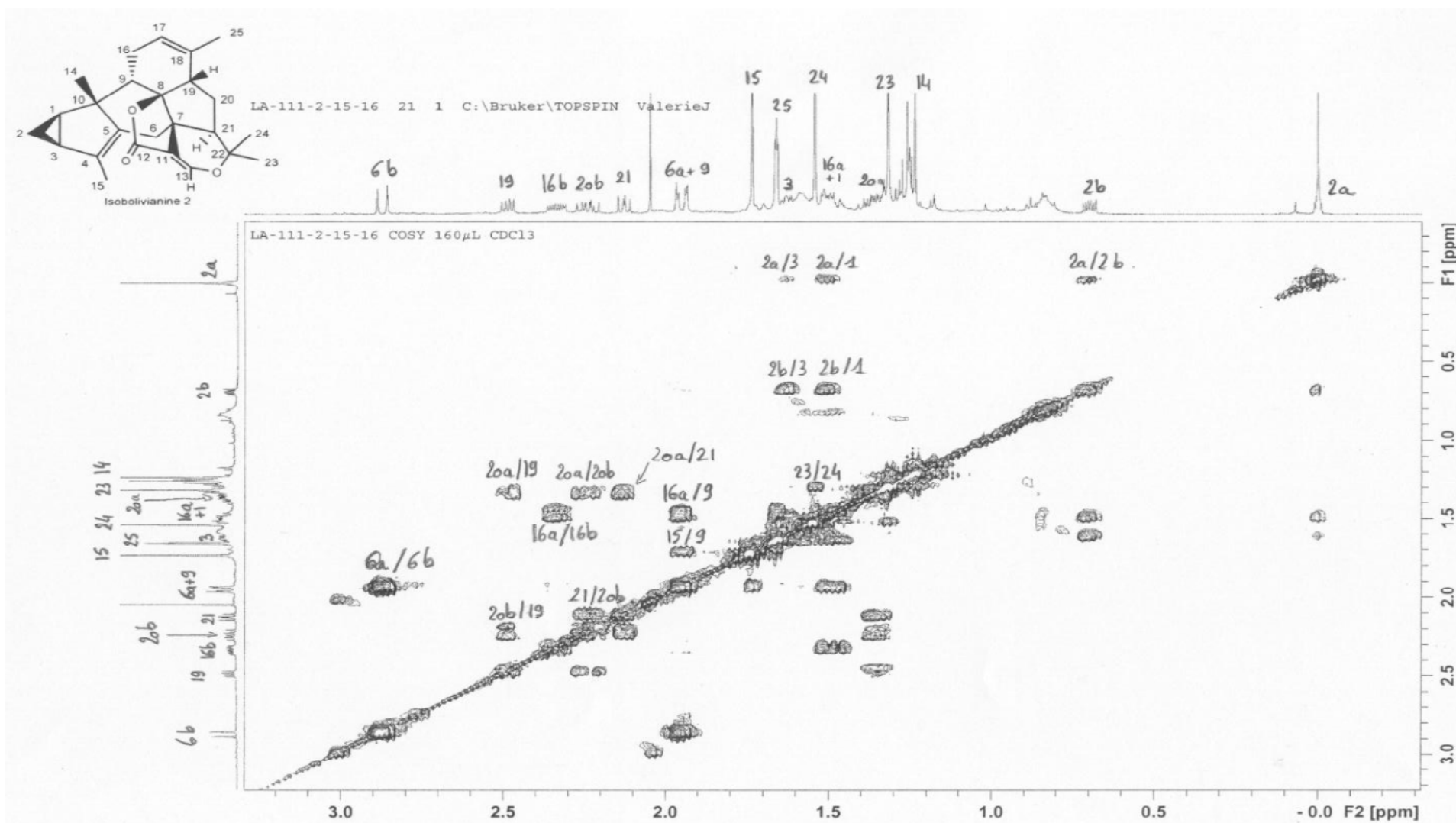


Figure 100.- Spectre RMN COSY de l'isobolvianine (M6) dans le CDCl₃ (Elargissement)

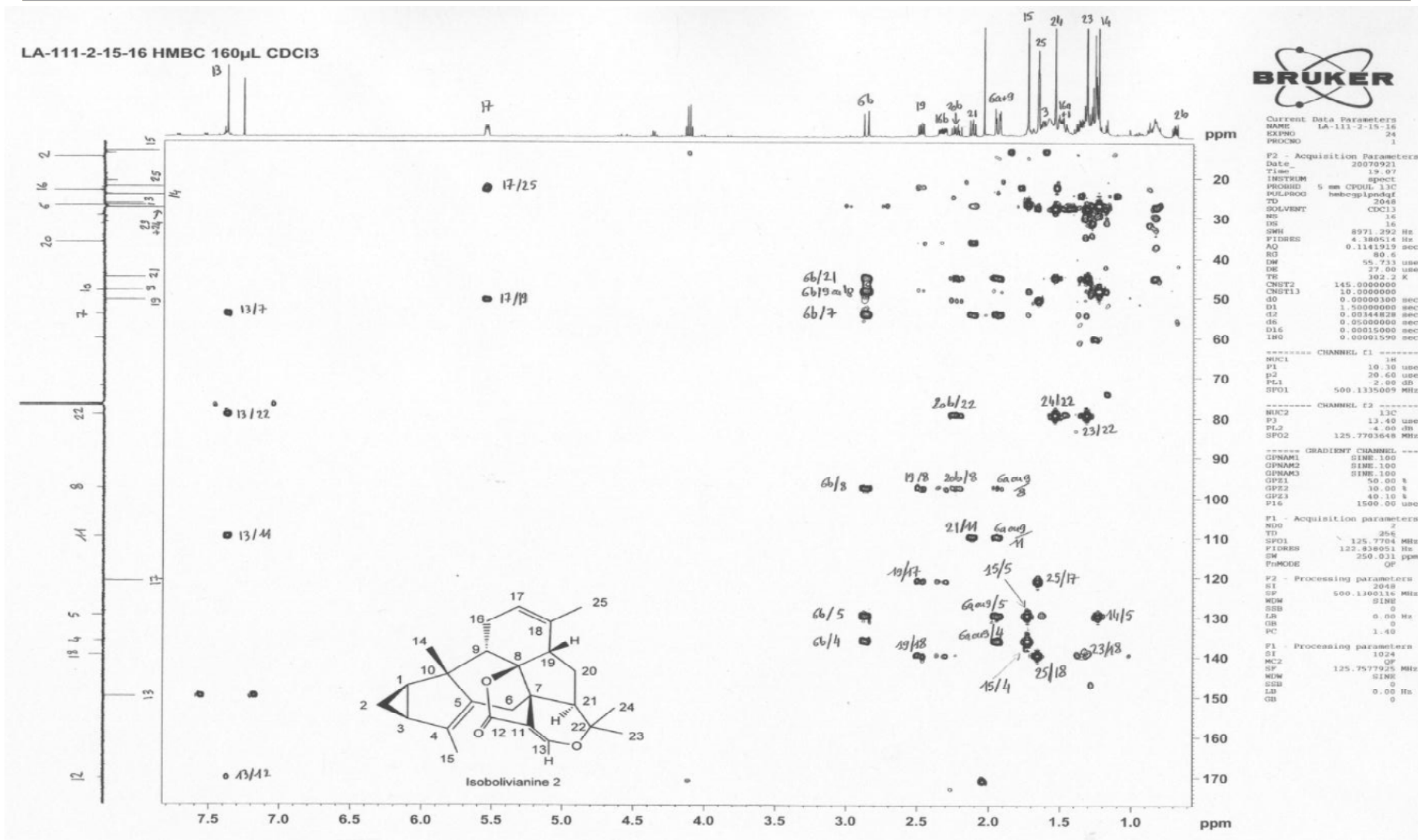


Figure 101.- Spectre RMN HMBC de l'isobolivianine (M6) dans le CDCl₃

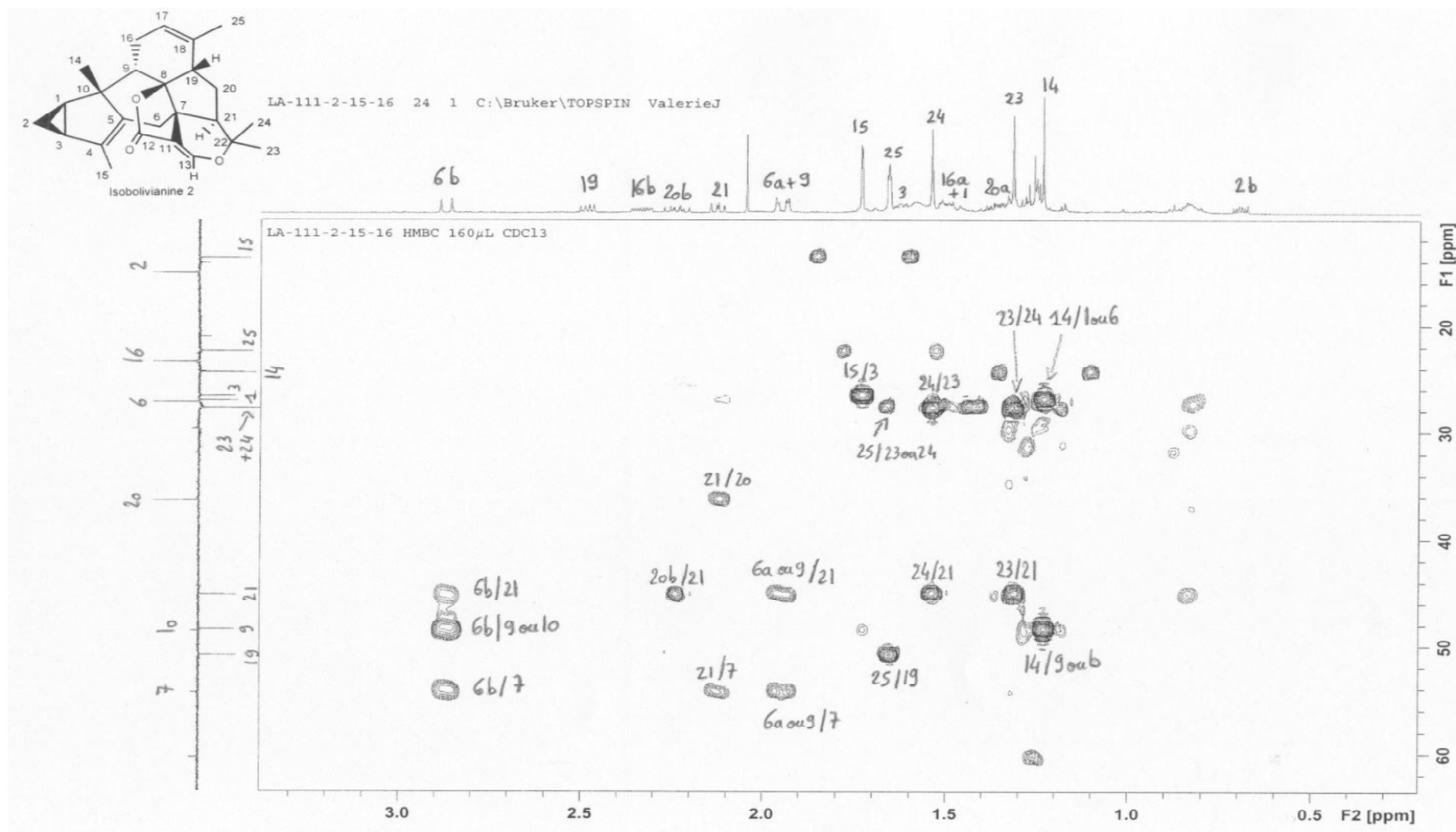


Figure 101.- Spectre RMN HMBC de l'isobolivianine (M6) dans le CDCl₃ (Elargissement)

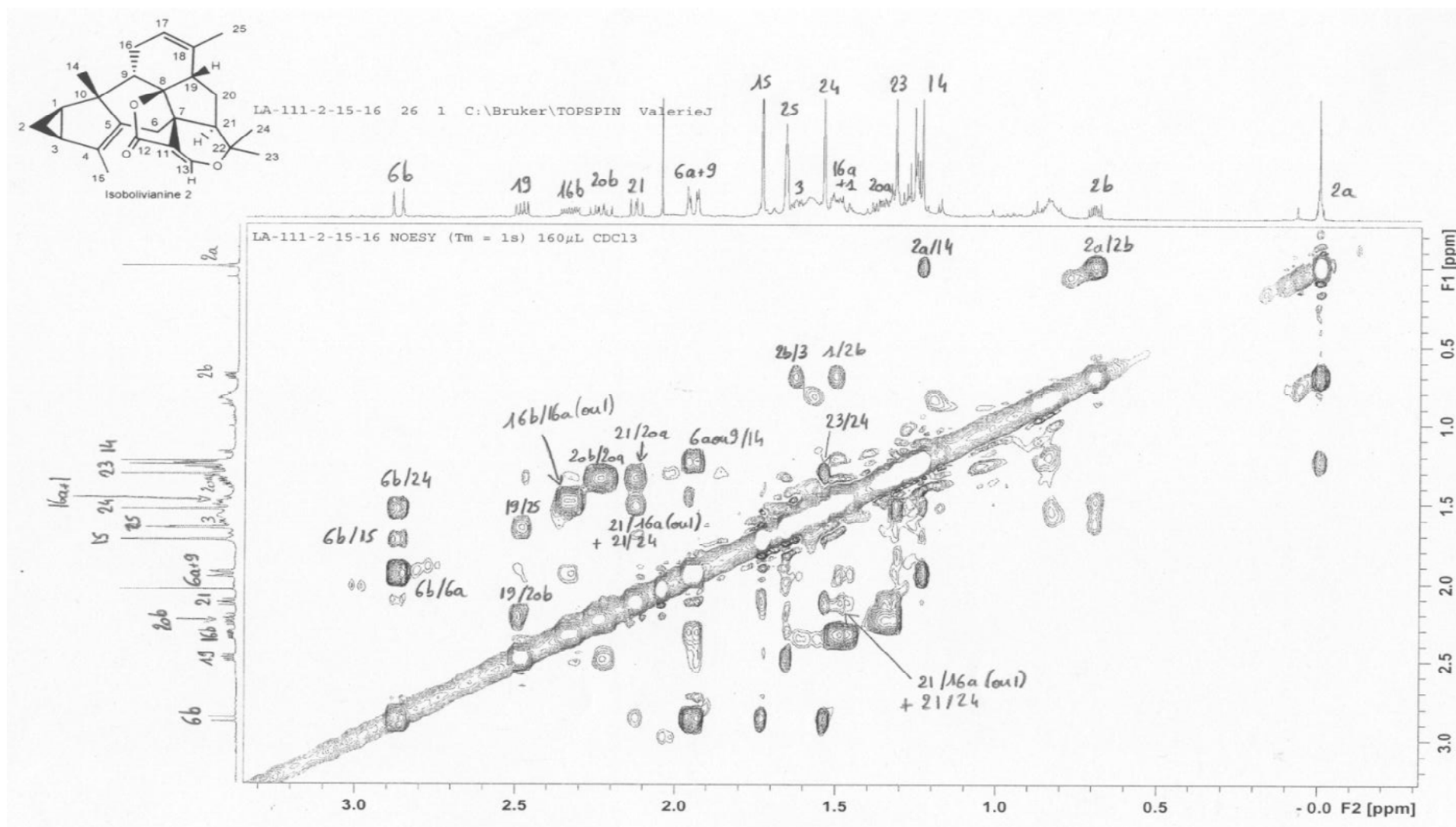


Figure 101.- Spectre RMN NOESY de l'isobolivianine (M6) dans le CDCl_3

VIII. Publications

1. **Acebey Lucia**, Sauvain M., Beck S., Moulis C., Giminez A., Jullian V. Bolivianine, a new sesterpene with unusual skeleton from *Hedyosmum angustifolium*, and its isomer, isobolivianine. *Organic Letters*, 2007, 9(23), 4693-4696.
2. **Acebey Lucia**, Apaza A., Michel R., Beck S., Jullian V., Ruiz G., Giminez A., Chevalley S., Sauvain M. The living library of the Cotapata National Park in Bolivia. An example of application of Bolivian law on the access to generic resources. *Biodiversity and Conservation* 2007 (*in press*).
3. Jullian V., Bonduelle C., Valentin A., **Acebey Lucia**, Duigou A., Prévost M, Sauvain M. New clerodane diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005, 15, 5065-5070.

Bolivianine, a New Sesterpene with an Unusual Skeleton from *Hedyosmum angustifolium*, and Its Isomer, Isobolivianine

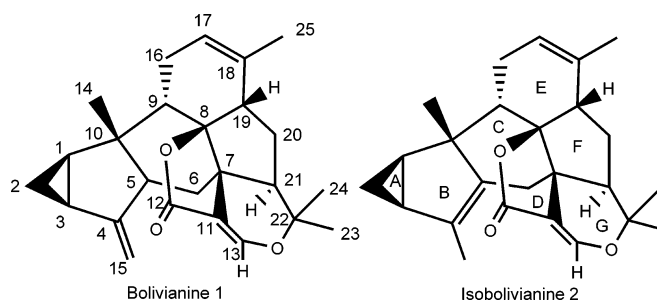
Lucia Acebey,^{†‡} Michel Sauvain,[†] Stephan Beck,[§] Claude Moulis,[†]
Aberto Gimenez,[‡] and Valérie Jullian^{*,†}

UMR 152 Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Université de Toulouse
3, Faculté des sciences pharmaceutiques, 31062 Toulouse, France, IIFB,
Universidad Mayor San Andrés, Facultad de ciencias farmaceuticas y bioquimicas,
Av. Saavedra 224, Miraflores, La Paz, Bolivia, and Herbario Nacional de Bolivia,
Universidad Mayor San Andrés, Cota Cota, Calle 27, La Paz, Bolivia

jullian@cict.fr

Received July 4, 2007

ABSTRACT



Bolivianine, a novel sesterpene with an unprecedented skeleton, has been isolated from the trunk bark of *Hedyosmum angustifolium* (Chloranthaceae), with isobolivianine, an isomer formed under acidic conditions. The structure and relative stereochemistry were elucidated on the basis of spectroscopic data. A hypothesis for biogenesis was made.

Hedyosmum angustifolium (Chloranthaceae) is a small tree growing in the humid high montane tropical Andean forest of Bolivia, Peru, and Ecuador. The rarity of chemical data about the genus *Hedyosmum* motivated us to study the composition of *H. angustifolium* in our ongoing program of research for new bioactive compounds in the Bolivian flora. The program started with the organization of six permanent sampling plots in different mountain forests between 1600 and 2700 m on the east side of the Andean Cordillera in Bolivia, in The Cotapata National Park near to La Paz.

The only previous chemical study on *H. angustifolium* concerned its essential oil composition,¹ and there are only

a few phytochemical studies on the genus *Hedyosmum*. Flavonoid glycosides² were isolated, as well as sesquiterpene lactones: 7,10-epoxyhedyosminolide, a guainolide, was isolated from *H. arborescens*,³ and the onoseriolide, a lindenane, was isolated from *H. brasiliense*.⁴ Lindenane sesquiterpene lactones are widely distributed in the Chloranthaceae family, as shown by numerous publications by Kawabata et al.,⁵ who also described some new skeletons in this family such as

(1) Lorenzo, D.; Loayza, I.; Dellacassa, E. *Flavour Fragrance J.* **2003**, *18*, 32–35.

(2) Cardenas, L. C.; Rodriguez, J.; Villaverde, M. C.; Riguera, R.; Cadena, R.; Otero, J. A. *Planta Med.* **1993**, *59*, 26–27.

(3) Bercion, S.; Coupe, de K/Martin, M.-A.; Baltaze, J.-P.; Bourgeois, P. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 620–624.

(4) Trentin, A. P.; Santos, A. R. S.; Guedes, A.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B. *Planta Med.* **1999**, *65*, 517–521.

[†] IRD and Université de Toulouse 3.

[‡] IIFB, Universidad Mayor San Andrés.

[§] Herbario Nacional de Bolivia, Universidad Mayor San Andrés.

Table 1. NMR Data for Compound **1** (C₆D₆)^a

	δ C	δ H	mult. (<i>J</i> in Hz)		HMBC (H→C)	COSY	NOESY
1	26.1 ^b	1.46	m	CH		2a, 2b, 3, or 6b	2a, 16b, 9
2a	16.3	0.70	ddd: 5.1; 8.5; 9.0	CH ₂	3 or 16 (w), 4 (w), 10 (w) ^c	1, 2b, 3, or 6b	1, 2b, 3, or 6b
2b		0.91	m			1, 2a, 3, or 6b	2a, 14
3	23.5	1.94	m	CH	7, 8, 10, 21 (w)	1, 2a, 2b, 6a	2a, 5, 6a, 15a, 21, 23
4	152.8			C			
5	52.1	2.55	bdd: 2.1; 12.7	CH	1 or 6 (w), 4, 10, 14, 15 (w)	6a, 15a, 15b	3 or 6b, 16a, 21
6a	26.2	1.35	dd: 12.9; 14.2	CH ₂	5, 11, 21	5, 6b	3 or 6b, 14
6b		1.94	dd: 2.2; 14.2		7, 8, 10, 21 (w)	1, 2a, 2b, 6a	2a, 5, 6a, 15a, 21, 23
7	52.5			C			
8	96.9			C			
9	46.5	2.30	m	CH	5, 8, 10, 14 (w)	16a	14, 1, 16a
10	39.8			C			
11	110.3			C			
12	168.5			C			
13	149.4	7.39	s	CH	7, 11, 12, 22		
14	20.5	1.00	s	CH ₃	1 or 6, 2, 5, 9, 10		2b, 6a, 9
15a	105.4	4.74	bs	CH ₂	3 or 16, 5	5, 15b (w)	3 or 6b, 15b
15b		5.18	bs		3 or 16, 5	5, 15a (w)	15a
16a	23.4	1.73	m	CH ₂		9, 16b	5, 16b
16b		2.28	m		8, 9 (w), 17, 18	16a, 17	1, 16a, 17
17	120.5	5.63	m	CH	3 or 16, 9 (w), 19	16b, 25	16b, 25
18	140.0			C			
19	51.6	2.63	dd: 8.1; 12.0	CH	8, 9, 17, 18, 20, 25	20a, 20b	20b, 25
20a	35.3	1.10	m	CH ₂		19, 20b, 21	20b, 21
20b		2.07	ddd: 6.8; 12.0; 14.0		8, 19, 21, 22	19, 20a, 21	19, 20a, 24
21	44.3	1.69	dd: 6.9; 11.2	CH	7, 11, 20	20a, 20b	5, 20a
22	78.4			C			
23	27.2	1.16	s	CH ₃	21, 22, 24	24	3 or 6b, 21, 24
24	27.3	1.01	s	CH ₃	21, 22, 23	23	20b, 21, 23
25	22.5	1.62	bt: 1.9	CH ₃	17, 18, 19	17	17, 19

^a Spectra recorded at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C. ^b Ambiguous signals are highlighted in bold or italic. ^c The (w) indicates a weak signal.

the shizukaols (sesquiterpene dimers)⁶ or sesquiterpene trimers.⁵

In this paper, we describe the isolation and structure elucidation of bolivianine (**1**) and isobolivianine (**2**), new sesterpenes with an unprecedented skeleton. Biosynthesis from onoseriolide (**3**), a sesquiterpene lactone already isolated from the genus *Hedyosmum* and other Chloranthaceae is proposed.

Two samples of the plant material consisting of trunk bark of *H. angustifolium* were collected in August 2004 and August 2005 on two different trees in the plots of the Cotapata National Park, Bolivia. Each sample (1 kg) was air-dried and powdered.

The ethyl acetate extract of the first sample was submitted to successive flash column chromatography on silica gel; 5.4 mg of a pale yellow oil was obtained. A first ¹H NMR was run in deuterated chloroform, then the solvent was removed and the sample stored at room temperature, before a second ¹H NMR spectra and more detailed NMR could be run. Isobolivianine (**2**) of 80% purity was identified. Additional purification of **2** gave pure isobolivianine. Still, we noticed some changes between the first and the second ¹H spectra. To confirm the isolation of this unusual sesterpene,

the second sample of plant material was submitted to the same purification scheme. Six milligrams of a product with the same TLC profile and mass spectra as isobolivianine was isolated. To obtain complementary NMR data, and especially to avoid any signal overlap hindering the determination of the relative stereochemistry of isobolivianine, NMR was run in deuterated benzene, which unexpectedly enabled the structure of bolivianine (**1**) to be determined. Indeed, **1** was also isolated the first time, as shown by the first ¹H NMR, but it was isomerized when we recorded the second ¹H spectra. We reproduced this isomerization by dissolving bolivianine **1** in deuterated chloroform and removing the solvent under reduced pressure. This was an expected double bond migration in acidic medium, leading to the most substituted alkene. So **1** was the natural compound and **2** an artifact. Kawabata et al. already described such an acid-catalyzed isomerization of shizukanolide,⁷ a lindenane sesquiterpene lactone isolated from *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae), structurally related to bolivianine.

The structure of **1** (C₂₅H₃₀O₃, HRTOFESIMS)⁸ was determined by careful analysis of its NMR data, which are

(5) Kawabata, J.; Fukushi, E.; Mizutani, J. *Phytochemistry* **1997**, *47*, 231–235 and refs cited therein.

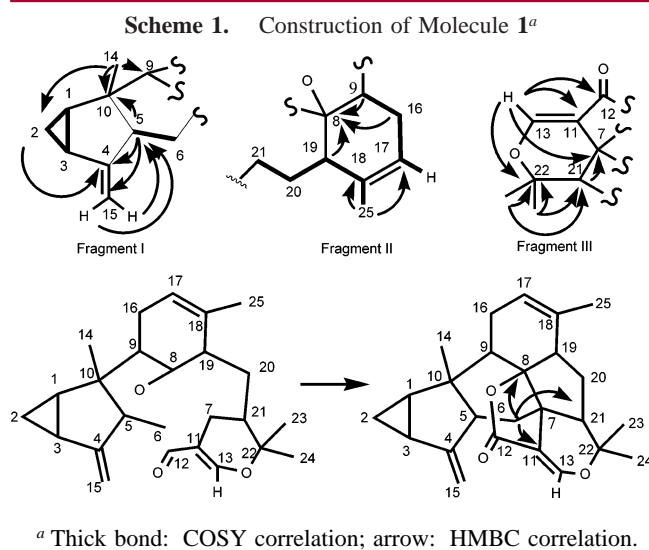
(6) Kawabata, J.; Fukushi, E.; Mizutani, J. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 121–125.

(7) Kawabata, J.; Tahara, S.; Mizutani, J. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 1447–1453.

(8) Compound **1**: [α]_D²⁵ –50 (c 0.2, CHCl₃); IR (KBr) 2929, 2849, 1752, 1643, 1449, 1384, 1215; HRTOFESIMS *m/z* 379.2285 (M + H⁺, calcd for C₂₅H₃₁O₃ 379.2273).

summarized in Table 1. **1** displayed 25 carbons in the ^{13}C NMR spectrum: one carbonyl from a carboxylic acid derivative, three sp^2 quaternary carbons, one sp^2 methylene, two sp^2 methines, four sp^3 quaternary carbons, six sp^3 methines, four sp^3 methylenes, and four methyls. The ^1H NMR spectrum indicated an ethylenic proton at 5.63 ppm, two ethylenic geminal protons at 4.74 and 5.18 ppm, and a singlet at 7.39 ppm.

The construction of molecule **1** is summarized in Scheme 1. The structure of three fragments was identified thanks to



COSY and HMBC correlations and connected to one another through C9 and C21. To close the structure, we used the HMBC correlations of H6a and H6b, which were no longer ambiguous with H1 because of the distance between the two positions. The lactone between C8 and C12 closed the structure.

The structure of **2** ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_3$, HRTOFESIMS)⁹ was determined in a similar way. ^1H and ^{13}C NMR spectra of **2** are described in Table 2.

The relative stereochemistry of **1** and **2** was determined by analysis of coupling constants and NOESY experiments, as shown in Figure 1.

For **1**, we assigned the position of the protons and methyl 14 on rings A and B: H1 and H3 were *syn* on ring A, and H1 had NOESY correlation with H2a, so these three protons were *syn* on ring A. Methyl 14 had NOESY correlation with H2b, so it was *anti* to H1 and H3 on ring B. Then, the axial or equatorial positions on the ring C were assigned as follows. The coupling constants of H5 and the two H6 showed that H5 was axial, H6a was axial and H6b was equatorial. Methyl 14 had NOESY correlation with H6a, so it was axial, *anti* to H5. Methyl 14 also had NOESY correlation with H9, so H9 was equatorial. Therefore the C9–C16 bond was axial, as confirmed by a NOESY

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR for Compound **2** (CDCl_3)^a

	δC	δH	mult. (J in Hz)
1	27.1 ^b	1.52	m
2a	15.1	0.02	m
2b		0.72	ddd: 3.9; 7.4; 8.0
3	26.7	1.65	m
4	136.2		
5	129.8		
6a	27.2	1.97	m
6b		2.89	d: 14.9
7	54.4		
8	97.8		
9	48.5	1.97	m
10	48.6		
11	110.1		
12	170.5		
13	150.0	7.40	s
14	24.5	1.26	s
15	13.7	1.76	d: 1.2
16a	23.5	1.51	m
16b		2.37	m
17	121.1	5.57	de: 7.4
18	139.8		
19	50.9	2.51	dd: 6.4; 11.9
20a	36.5	1.37	m
20b		2.26	ddd: 7.9; 12.1; 13.7
21	45.2	2.15	dd: 7.8; 10.1
22	79.4		
23	27.7	1.34	s
24	27.7	1.56	s
25	22.5	1.68	bs

^a Spectra recorded at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C . ^b Ambiguous signals are highlighted in bold and italics.

correlation between H5 and H16a. The C8–C19 had to be equatorial because of the junction between rings C and D. If the C8–C19 bond was equatorial, then the C8–O bond was axial so the C7–C11 bond must be equatorial, *syn* to the methyl 14. This was confirmed by the NOESY correlation between H21 and H5, which also indicated H21 stereochemistry. Furthermore, H21 had NOESY correlation with H20a, H19 had NOESY correlation with H20b, therefore H19 and H21 had to be *anti* on ring F. The use of NOESY effects on five-membered rings often leads to mistakes because these rings are conformationally flexible. In this case, however, the polycyclic structure hindered flexibility. This was confirmed by the coupling constants of H19 and H21 with H20a and H20b, which were higher than usual for a five-membered ring.

For **2**, we saw the same NOESY correlations between H1, H2, H3, and methyl 14, so the stereochemistry around ring A and B was the same as above. The lack of H5 and the overlap between H6a and H9 signals made the assignment of the stereochemistry for ring C more difficult. H16a had NOESY correlation with H21. This was possible only if the C9–C16 and C7–C21 bonds were *anti* to methyl 14 on ring C. Therefore, the stereochemistry around ring C was the same as for **1**. The NOESY effects between H19, H20, and H21 were the same as for **1**, and H21 pointed inside ring C

(9) Compound **2**: $[\alpha]_D^{25} -80$ (c 0.2, CHCl_3); IR (KBr) 2927, 2853, 1755, 1646, 1457, 1371, 1223, 1197; HRTOFESIMS m/z 379.2258 ($M + H^+$, calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}_3$ 379.2273).

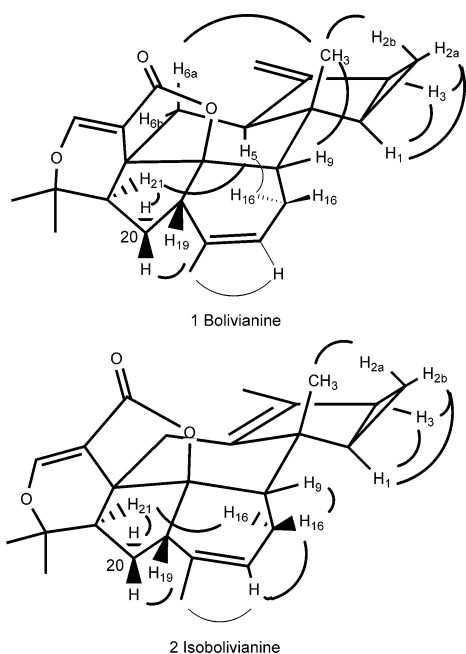


Figure 1. Key NOESY for bolivianine and isobolivianine.

because of its NOESY with H16a. So, as we expected, the relative stereochemistries of **1** and **2** were the same.

Then, we made a hypothesis for the biogenesis of **1**. Retrosynthetic analysis (Figure 2) showed that this sesterpene

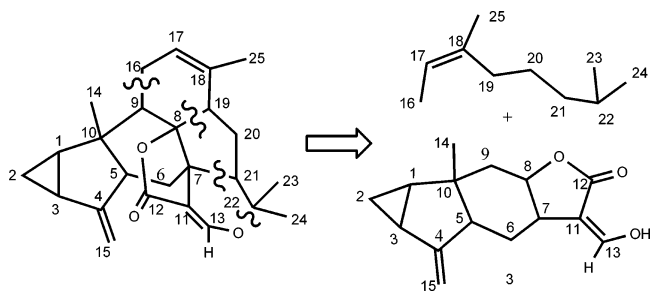
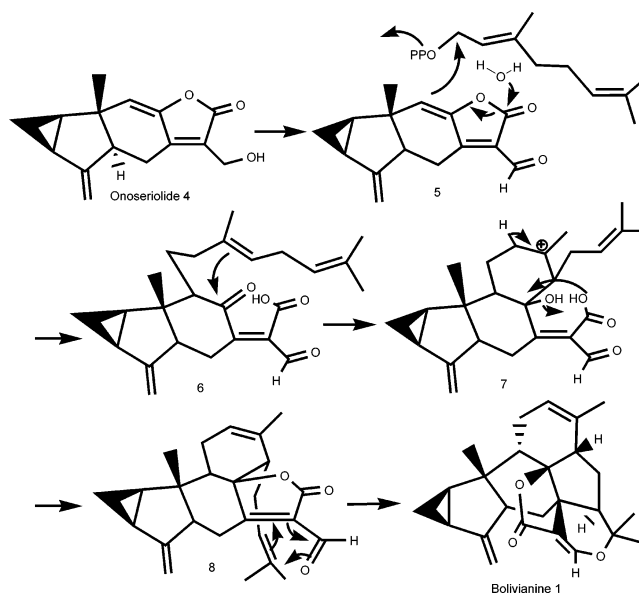


Figure 2. Retrosynthetic analysis of bolivianine.

could be obtained by the condensation of a lindenane sesquiterpene skeleton (**3**) with a geranyl moiety.

In Scheme 2, we propose a possible biogenetic pathway from onoseriolide to bolivianine. After an allylic oxidation, onoseriolide gave aldehyde **5**. Hydrolysis of **5** allowed nucleophilic attack of the enol on a geranylpyrophosphate molecule. After isomerization of the geranyl moiety, **6** was obtained. Nucleophilic attack of the geranyl double bond allowed the formation of the C ring, followed by dehydration giving the lactone **8**. A Diels–Alder reaction gave the G and F ring and compound **1**.

Scheme 2. Hypothesis for the Biogenesis of **1**



Onoseriolide is closely related to shizukanolides, for which the relative and absolute stereochemistries have been determined.⁷ The relative stereochemistry we proposed for **1** was in agreement with this previous study, and a hypothesis for the absolute configuration for **1** can be made.

Compounds **1** and **2** displayed no significant activity on *Plasmodium falciparum* or on the MCF7 cell line.

This study is a preliminary report of an unprecedented sesterpene skeleton, found in *Hedyosmum angustifolium*. Other compounds from this plant are currently under investigation by our team and will be reported.

Acknowledgment. L.A. thanks the IRD for a grant. We thank the people of the communities in the National Park of Cotapata, the students and staff of the Institute of Ecology and of Tunquini biological station (University of San Andrés, La Paz) especially A. Apaza, R. de Michel, and A. Palabral for their technological support. The authors thank the French Ministry of Research for funding (Pal +), and the administrative support of the Bolivian Ministry of Rural Development, Farming and Environment and its departments (DGB and SERNAP). We thank P. Winterton (Université Toulouse 3) for kindly revising the English. We also thank L. Marcourt (ISTMT, UMS 2597, Pierre Fabre-CNRS) for the NMR spectra of isobolivianine, and S. Chevalley (UMR 152) for the biological evaluation.

Supporting Information Available: One- and two-dimensional NMR spectra for bolivianine and isobolivianine. Purification scheme for bolivianine. Experimental procedure for the isomerization of bolivianine. Details for the biological evaluation. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

OL7015725

The living library of The Cotapata National Park in Bolivia: an example of application of Bolivian law on the access to genetic resources

Lucia Acebey · Amira Apaza · Rosy de Michel ·
Stephan Beck · Valérie Jullian · Grace Ruiz ·
Alberto Gimenez · Séverine Chevalley · Michel Sauvain

Received: 15 June 2007 / Accepted: 25 October 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract Developing countries with a rich biodiversity want to control the use of this natural patrimony, especially in the research of natural compounds of pharmaceutical interest. Here we present the organization of six permanent plots in a mountain tropical forest on the east side of the Andean Cordillera in Bolivia, and their role in the discovery of plants with antiplasmodial or antileishmanial activities. Permanent plots are widely used in ecological survey, but rarely in bioprospecting. This set-up allows Bolivian authorities to control the bioprospecting, and facilitates further chemical studies on the bioactive plants.

Keywords Protected area · Bolivia · Mountain forest · Natural products · Antiplasmodial · Antileishmanial · Bioprospecting

Introduction

Developing countries with a rich biodiversity want to take advantage of this natural patrimony to boost their development. The discovery of new bioactive natural compounds in

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:[10.1007/s10531-007-9296-x](https://doi.org/10.1007/s10531-007-9296-x)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Lucia Acebey and Amira Apaza have contributed equally to this work.

L. Acebey · G. Ruiz · A. Gimenez
Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas,
Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224, La Paz, Bolivia

A. Apaza · R. de Michel · S. Beck
Herbario Nacional de Bolivia, Universidad Mayor de San Andrés, Correo Central, Casilla 10077, La Paz,
Bolivia

V. Jullian · S. Chevalley · M. Sauvain (✉)
UMR 152 IRD, Université Paul Sabatier Toulouse 3, 31062 Toulouse cedex 9, France
e-mail: michel.sauvain@ird.fr

their biodiversity could be a new source of income for them (Balick and Mendelsohn 1992; Svarstad et al. 2000), though the evidence is equivocal (Firn 2003). Half of the drugs on the market today come from natural sources, mostly plants or microorganisms (Cordell 2000).

The ethnopharmacological survey is the most popular way to select plants with biological activities. However medicinal plants do not represent the entire flora of a high biodiversity area. Moreover plants coming from an ethnopharmacological study can only be used with the permission of the local community which is the depository of the traditional knowledge, and which can refuse to give it (Lewis et al. 1999).

The aim of our work is to emphasize the knowledge and the value of some protected areas of high biodiversity, with the agreement of the governments. This work respects the Bolivian Environmental Law No. 1333 of 1992 and the Rio de Janeiro Convention on Biological Diversity signed in 1992 (<http://www.cbd.int/convention/convention.shtml>), signed by the Bolivian government and ratified as “ley de la Republica No. 1580” of July 25, 1994. The regulatory laws and rules for biodiversity conservation in Bolivia are young. Regulations concerning genetic resources are based on the Decision 391 of the “Agreement of Cartagena”: Common Regime on Access to Genetic Resources of the Andean Community of Nations, formalized by the “Supreme Decree 24676” of June 1997 (Gaceta oficial 1997). The process of their application is still weak. No more than nine petitions for access to genetic resources have been submitted between 1996 and 2003 to the Bolivian governmental authorities so far two access contracts has been signed (Ministry for Sustainable Development 2004).

Here we describe the organization of plots that contain species of the trees found in a selected area of the mountain forest. The area has been chosen to mimics the originality of the flora for the study that aims at finding plants with antiparasitic activity.

The mountain forests are amongst the least known and most threatened in the tropics (Carrizosa 1990; Dodson and Gentry 1991; Henderson et al. 1991). Due to their geomorphologic and climatic complexity, they present several biotopes with high endemic flora (Gentry 1995). Altitude plays an important role in the composition of these ecosystems. Biodiversity lower on the mountain is richer than in higher forests. The mountain forests in Bolivia where the study was carried out are below the Royal Cordillera and are composed of very rich ecosystems with a high degree of biodiversity; making them of great interest for conservation (Moraes 2000).

Methodology

Organization of the plots

This study takes place in the highest portion of the east side of the Andean Cordillera in Bolivia, in a region called the “Yungas”. A national park (Parque Nacional y Área Natural de Manejo Integrado Cotapata PN-ANMI) was created in 1993. This park covers an area of nearly 60.000 ha (67°43′–68°02′ W and 16°05′–16°20′ S). Altitude ranges between 1,000 and 5,900 m, and the area is accessible by road: the lower part of the park is located 90 km NE from La Paz, and can be reached by car in 2.5 h. Climatic conditions vary according to the altitude, from areas with daily frost to hot tropical parts with an annual rainfall ranging from 1,000 mm to over 5,000 mm, and with a marked dry season between April and September (Ribera 1995; Ribera and Liberman 2006; Schawe et al. 2006).

In 1998, the Ecology Institute of the La Paz University (UMSA) installed a permanent research station (Ecological Station of Tunquini), which is used for climatologic, zoological and botanical surveys (Bach et al. 2003; Deem et al. 2004; Krömer et al. 2005).

In 2001, the DGB (General Authority on Biodiversity, Ministry for Sustainable Development, Bolivia) and the SERNAP (Protected Areas Department) gave us permission to conduct research in the National Park of Cotapata to valorize plant diversity. The resulting study deals with the concept of the pharmacological value of the flora of this park, especially for malaria and leishmaniasis. Permission for this study was granted in 2001 (note DGB/CITES No. 1314/01, the 17th of September 2001) and it was renewed in 2006 for three more years (note DGBAP/UVS No. 988/06, the 14th of September 2006).

According to Ribera (1995) the park has five main types of vegetation, changing according to the altitude. We prepared six plots in two types of forests that host the tree population of cloud forest and the mountain Yungas forest.

The cloud forest (2,300–3,500 m) has relatively small, twisted trees (10–15 m), and a canopy covered with numerous epiphytes. Some trees can reach 30 m of height. The lower part consists of lianas and bamboos. Two plots were prepared in this biotope at different altitude, so they contain different species.

In the mountain Yungas forest (1,200–2,300 m) trees are higher (15–20 m), and few trees reach more than 30 m. Four plots were set up in this biotope. Plots have been chose for their different sun exposures, in order to maximize the diversity of the species.

These six plots (20 × 20 m) were organized between October 2001 and October 2002. A phenologic monitoring was carried out on a monthly basis between 2002 and 2005, in order to spot fertile species and identify them. In every parcel, each individual with a DBH >8 cm was marked, and a voucher specimen was deposited in the Bolivian National Herbarium (LPB). During the second part of this project, samples of bark and leaves were collected from each individual identified in the various species, in order to analyse their chemical and pharmaceutical properties. These small samples (100 g of dry organ) were collected without endangering the life of the individual trees.

Plots are located as indicated in Table 1.

Determination of antiparasitic activity

Plants were collected, air dried and ground. For each resulting powder, 10 g were then left overnight in 100 ml of ethanol, and filtered. Ethanol was removed under reduced pressure and the antiparasitic activity of the extracts was evaluated.

Plasmodium falciparum was cultured according to the method described by Trager and Jensen (1976) with modifications (Benoit et al. 1995). Cultures were synchronized by 5% D-sorbitol lysis (Merck, Darmstadt, Germany) (Benoit et al. 1995). FcB1-Columbia was considered as a chloroquine-resistant strain. In vitro antimalarial activity was evaluated by [³H]-hypoxanthine (ICN, France) incorporation as described by Desjardins et al. (1979).

Table 1 Localization of the plots in the park of Cotapata

	Plot 1	Plot 2	Plot 3	Plot 4	Plot 5	Plot 6
Altitude (m)	1580	1660	1720	2000	2365	2730
Geographical coordinates	16°11.600' S 67°52.164' W	16°11.646' S 67°52.051' W	16°11.520' S 67°52.292' W	16°12.815' S 67°53.274' W	16°11.635' S 67°53.187' W	16°11.968' S 67°53.523' W
Exposure	South East	South East	South West	North West	North West	North West
Type of vegetation	Lower Yungas forest	Lower Yungas forest	Lower Yungas forest	Moist upper Yungas forest	Cloud forest	Cloud forest

Incubation time between parasite culture and the drugs was 48 h. The IC_{50} of the reference drug chloroquine was 145 nM. Extracts with an $IC_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$ were considered active against *P. falciparum*.

Promastigotes of *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania donovani* were exposed to different concentrations (10–100 $\mu\text{g/ml}$) of each extract for 72 h. Effect of extracts was compared with effect observed in parasites cultured in presence of amphotericin B and pentamidine (reference drugs for *Leishmania* species) as described in Osorio et al. (2007).

The antileishmanial activity against axenic amastigote (*Leishmania amazonensis*) was determined after 72 h incubation by a colorimetric method based on the reduction of tetrazolium salt (MTT, Sigma) (Serenio and Lemesre 1997a, b). The IC_{50} of the reference drug Amphotericin B was 300 nM. Extracts with an $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ were considered active against *Leishmania*.

Results and discussion

Supplementary Table 2 shows the altitudinal distribution of families, species and individuals. A total of 498 trees were marked in six plots. Species were identified for 442 individuals (89%), and genera for 49 individuals (10%). A total of 106 different species were identified among 31 families.

Rubiaceae, Melastomataceae and Euphorbiaceae were all present in five plots. The analysis of the number of individuals in each parcel shows that some species and families are well represented. At 1,580 m, two species of the Rubiaceae family, *Guettarda sabiceoides* and *Psychotria tinctoria*, are extremely well represented. At 1,660 m, the best represented families were Melastomataceae (*Meriania* aff. *axinioides*, *Miconia punctata*), and Rubiaceae (*Faramea candelabrum*, *Bathysa obovata*, *Elaeagia* cf. *marieae*). At 1,720 m, the best represented families are Lauraceae, Chloranthaceae (*Hedyosmum racemosum*), and Euphorbiaceae (*Alchornea triplinerva*). At 2,000 m, forests are dominated by Lauraceae, of the genus *Nectandra* (*N. cissiflora*, *N. turbacensis*), Rubiaceae (*Psychotria conephoroides*) and Melastomataceae (*Miconia affinis*). At 2,365 m, the main families are Melastomataceae (*Tibouchina bicolor*), Clethraceae (*Clethra revoluta*) and Saxifragaceae (s.l.) (*Escallonia paniculata*). Finally, at 2,730 m, the main families are the tree ferns (*Cyathea delgadii*), Podocarpaceae (*Podocarpus rusbyi*) and Cunoniaceae (*Weinmannia microphylla*).

The plot organization of 2001 is still in use. The amount of dead trees has been of 6% in 5 years (32 out of 499), which typical of Amazonian biotopes. Tree falls are caused by the weight of lianas and epiphytes, and by the high seasonal rainfalls in areas with steep slopes.

For the 106 taxa identified at species level, a bibliographic survey was performed on their chemical and biological properties. We searched in the following databases: Chemical Abstracts (<http://www.cas.org/>), Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>), Dictionary of Natural Products on CD-Rom (<http://www.ramex.com/cr/cr-dict0.html>), finding no publications for 81 taxa. There are no more than three publications for 19 taxa. The most analysed taxa are *Alchornea pubescens* (4 publications), *Dendropanax arboreus* (4 publications), *Tapirira guianensis* (5 publications) and *Virola sebifera* (17 publications). Therefore the chemical composition and the pharmacological properties of the species listed here deserve further investigations. The most studied concerning chemistry and pharmacology cited in the Supplementary Table 2 are not endemic of the Tunquini biotope. In the majority they are widely distributed in the mountain forest of the Andes and some are extending

to low land in Mesoamerica and Amazonian basin (<http://www.mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>). Some of them have extended medicinal uses in different countries (Duke and Vasquez 1994).

Several organs of the taxa identified for each species level were extracted, and the extracts were tested for their activities on two parasites: one of the genus *Leishmania*, responsible for leishmaniosis, and *Plasmodium falciparum*, a parasite responsible for malaria.

For leishmaniasis, a first screening on promastigote forms of the parasite gave seven active taxa. After assessing bibliographical information on the species and the genera, facilities of recollection and abundance of the resource, three taxa were selected for further studies and recollected. These three taxa were extracted and extracts were tested on the amastigote form of the parasite. One taxon remained active, and is currently under study to identify the active compounds (Acebey et al. 2005).

For malaria, the first screening gave seven active taxa. Among them, *Cinchona pubescens* is well known to contain quinine, a major drug used against malaria, and two other species (*Alchornea pearcei*, *Alchornea triplinervia*), belong to genera already studied for their antiplasmodial properties (Banzouzi et al. 2002). Three taxa remain unstudied as far as their antiplasmodial properties are concerned, and deserve further investigation to identify new antiplasmodial natural compounds.

This first set-up preparation of permanent plots to facilitate bioprospecting in the Yungas could be greatly improved by using larger portions of plots, and therefore obtaining a higher degree of biodiversity (Kessler 2001).

The creation of this “permanent tree-library” or “living library” showed its educational value for scientists and authorities. Researchers have a permanent access to the resource, and can conduct studies on the field or in laboratories. The authorities can control the use of genetic resources. The access permission has been renewed regularly in the last 6 years.

However in order to obtain the maximum benefits for the scientific and academic communities, this type of research needs stability and the knowledge of the concerned authorities to control and sustain the process. Our project is one of the first, where the Bolivian government had agreed to permit access to natural resources for scientific purpose. This gives new opportunities for foreign research institutes, who have to sign an agreement of cooperation with a national scientific institution and together have to present a proposal for research to the director of biodiversity of the ministry. Both documents have to be signed by this authority. Generally it is rather easy to get the permit for collecting plant specimens for taxonomic and phylogenetic DNA analysis, if Bolivian co-researcher or students are involved. LPB handle a big exchange program for herbarium specimens with several institutions around the world. Obviously none taxonomic research and especially genetic resources research will need to be approved by the national adviser committee. One of the positive aspects of our work was the use of the same scientific language of the people in charge of the administrative regulation and the researchers. This results from a significant effort of the San Andres University of La Paz (UMSA) to participate in all the crucial meetings to elaborate the national laws to protect and use the Bolivian biodiversity. In general, research on tropical biodiversity always demands an effort in terms of time and resources on taxonomic identification. Limiting factors are missing flowering and fruiting specimens and updated taxonomic treatments for the Bolivian and Andean flora. Only few people around the world are working on the taxonomy of neotropical plants, so more botanists must be trained to recognize and name the multitude of unknown species, a big challenge for science before these biodiversity will be lost for ever, not only for young botanists in developing countries but also in the industrial countries, where are closing more and more

museums with important collections of natural history or are not renewing the positions of retired curators.

Acknowledgements We thank people of the local communities in the National park of Cotapata, students, the technical staff of the Institute of Ecology and of the biological station Tunquini (University of San Andrés, La Paz) especially Edgar Mayta, Carla Maldonado, Angela Canseco, Cristina Lopez, Ninel Sanjinez and Arely Palabral for their technological support. The authors gratefully acknowledge the financial assistance of the French Ministry of Research (Pal +) and the administrative support of the Bolivian Ministry of Rural Development, Farming and Environment (former Ministry for Sustainable Development) and its departments (DGB and SERNAP).

References

- Acebey L, Jullian V, Estevez Y et al (2005) Leishmanicidal compounds from plants collected in an Andean Bolivian Valley. In: XVIth international congress for tropical medicine and malaria, Marseille, France
- Bach K, Schawe M, Beck S et al (2003) Vegetación, suelos y clima en diferentes pisos altitudinales de un bosque montano de Yungas, Bolivia: Primeros resultados. *Ecol Bolivia* 38:3–14
- Balick MJ, Mendelsohn R (1992) Assessing the economic value of traditional medicines from tropical rain forests. *Conserv Biol* 6:128–130
- Banzouzi JT, Prado R, Menan H et al (2002) In vitro antiplasmodial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* and identification of an active constituent: ellagic acid. *J Ethnopharmacol* 81:399–401
- Benoit F, Valentin A, Pelissier Y et al (1995) Antimalarial activity in vitro of *Cochlospermum tinctorium* tubercle extracts. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:217–218
- Carrizosa UJ (1990) La selva andina. In: Carrizosa UJ, Hernandez C (eds) *Selva y futuro*. El sello, Bogota, pp 151–184
- Cordell GA (2000) Biodiversity and drug discovery—a symbiotic relationship. *Phytochemistry* 55:463–480
- Deem SL, Davis R, Pacheco LF (2004) Serologic evidence of nonfatal rabies exposure in a free-ranging Oncilla (*Leopardus tigrinus*) in Cotapata National Park, Bolivia. *J Wildl Dis* 40:811–815
- Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD et al (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 16:710–718
- Dodson CH, Gentry AH (1991) Biological extinction in Western Ecuador. *Ann Mo Bot Gard* 78:273–295
- Duke JA, Vasquez R (1994) Amazonian ethnobotanical dictionary. CRC Press, London, 215 pp
- Firn RD (2003) Bioprospecting – why is it so unrewarding? *Biodivers Conserv* 12:207–216
- Gaceta Oficial de Bolivia (1997) Reglamento de la decisión 391 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, Decreto Supremo No. 24676, 21 de junio 1997, La Paz, Bolivia
- Gentry AH (1995) Pattern of diversity and floristic composition in neotropical montane forests. In: Churchill SP, Balslev H, Forero E et al (eds) *Biodiversity and conservation of neotropical montane forests*. The New York Botanical Garden Press, New York, pp 103–126
- Henderson A, Churchill SP, Luteyn JL (1991) Neotropical plant diversity. *Nature* 351:21–22
- Kessler M (2001) Patterns of diversity and range size of selected plant groups along an elevational transect in the Bolivian Andes. *Biodivers Conserv* 10:1897–1921
- Krömer T, Kessler M, Robbert Gradstein S et al (2005) Diversity patterns of vascular epiphytes along an elevational gradient in the Andes. *J Biogeogr* 32:1799–1809
- Lewis WH, Lamas G, Vaisberg A et al (1999) Peruvian medicinal plant sources of new pharmaceuticals (International Cooperative Biodiversity Group-Peru). *Pharm Biol* 37(sup 1):69–83
- Ministry for Sustainable Development (2004) The Bolivian experience in applying decision 391: the common regime on access to genetic resources. Vice-Ministry for Natural Resources and the Environment, General Authority on Biodiversity, La Paz, Bolivia
- Moraes RM (2000) La Estación Biológica de Tunquini: Un sitio favorable para entrenamiento e investigación biológica y ecológica de los bosques montanos de Bolivia. *Ecol Bolivia* 35:1–2
- Osorio E, Arango GJ, Jimenez N et al (2007) Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol* 111:630–635
- Ribera MO (1995) Aspectos ecológicos, del uso de la tierra y conservación en el Parque Nacional y Área Natural de Manejo Integrado Cotapata. In: de Morales CB (ed) *Caminos de Cotapata*. Instituto de Ecología, La Paz, pp 1–84
- Ribera MO, Liberman M (2006) El uso de la tierra y los recursos de la biodiversidad en las áreas protegidas de Bolivia. Un análisis crítico con propuestas para sus conservación y manejo sostenible. SERNAP—GEF II, La Paz, Bolivia

- Schawe M, Gerold G, Bach K, Gradstein SR (2006) Hydrometeorological patterns in relation to forest structure and plant species diversity along an elevational gradient in a montane cloud forest in the Yungas, Bolivia. In: Bruijnzeel S, Juvik J, Hamilton L (Hrsg) Proceedings of the 2nd international symposium on tropical montane cloud forests. Waimea, Hawaii, USA
- Sereno D, Lemesre JL (1997a) Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 41:972–976
- Sereno D, Lemesre JL (1997b) Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. *Parasitol Res* 83:401–403
- Svarstad H, Bugge HC, Dhillon SS (2000) From Norway to Novartis: cyclosporin from *Tolypocladium inflatum* in an open access bioprospecting regime. *Biodivers Conserv* 9:1521–1541
- Trager W, Jensen JB (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673–675

New clerodane diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities

Valérie Jullian,^{a,*} Colin Bonduelle,^a Alexis Valentin,^a Lucia Acebey,^a Anne-Gaëlle Duigou,^a Marie-Francoise Prévost^b and Michel Sauvain^a

^aUMR 152 (IRD-UPS) Institut de Recherche pour le Développement—Université Paul Sabatier, Faculté de Pharmacie, 35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse cedex 04, France

^bUS 084 IRD, Centre IRD de Cayenne, BP165 97323 Cayenne cedex, Guyane française

Received 25 April 2005; revised 22 July 2005; accepted 26 July 2005

Available online 13 September 2005

Abstract—Extracts of *Laetia procera* (Flacourtiaceae) displayed significant in vitro activity against *Plasmodium falciparum*. *P. falciparum* bioassay guided fractionation of a trunk bark extract of this plant led to the isolation of six clerodane diterpenoids (1–6) and a butanolide (7). Five of these compounds are new and called Laetiaprocerine A–D (3–6) and Laetianolide A (7). Their structures were established on the basis of 1D and 2D NMR experiments. Absolute configurations of 1 and 2 were determined by a modified Mosher's method and the absolute configuration of 5 by chemical correlation. The clerodane diterpenoids displayed activities against *P. falciparum* with an IC₅₀ down to 0.5 μM on FCb1 and F32 strains, and also cytotoxicity toward human tumor cell line MCF7. The most active compound showed a selectivity index of 6.8. Some of these compounds also displayed activities against *Leishmania amazonensis* amastigote axenic stages and promastigote.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

During our search for new bioactive agents from the biodiversity of French Guiana, extracts of *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae) showed significant activity on *Plasmodium falciparum* screening in vitro. *P. falciparum* bioguided fractionation allowed six clerodane diterpenes (compounds 1–6) and a new butanolide 7 (Fig. 1) to be isolated. Four of the clerodane diterpenoids are new (3–6). Such terpenoids have been found previously in the leaves of *Laetia procera* and in the fruits of *Laetia corymbosa*.^{1,2} The genus *Casearia* (Flacourtiaceae) has also been widely studied for the isolation of clerodane diterpenoids.^{3,4} Similar compounds have been reported in *Bucida buceru* (Combretaceae) and *Licania intrapetiolaris* (Chrysobalanaceae).^{5,6} The biological activities displayed by these products are mostly in vitro cytotoxicity on various tumor cell lines.^{7–10} Some of them are active on Sarcoma 180 ascites in mice.¹¹ They also show immunomodulato-

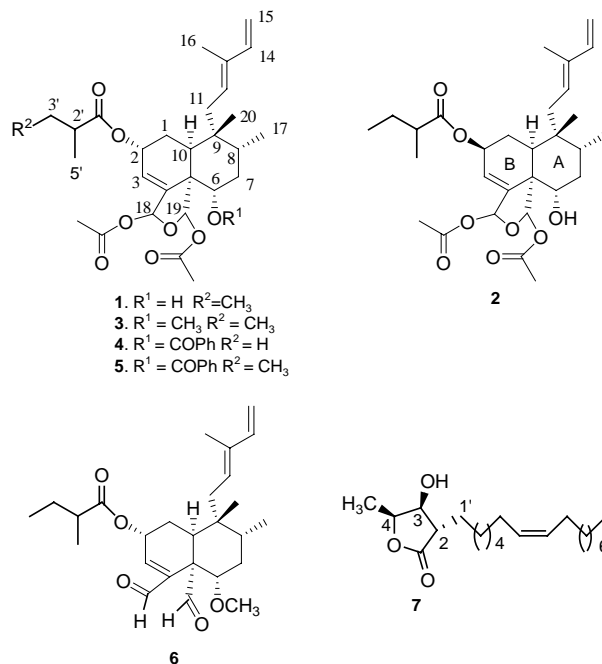


Figure 1. Compounds isolated from *Laetia procera*.

Keywords: *Laetia procera*; Flacourtiaceae; Clerodane diterpenoids; Butanolide; *Plasmodium falciparum*; Leishmania.

* Corresponding author. Tel.: +33 5 62 25 68 23; fax: +33 5 62 25 98 02; e-mail: jullian@cict.fr

ry properties and trypanocidal activity.^{12,13} Recently, antiplasmodial activity and a moderate activity against *Mycobacterium tuberculosis* have been reported.³ We believe that the present work is the first report of the antileishmanial activity of such compounds.

The trunk barks were collected in French Guiana, in the Saint Elie tropical rain forest. This sampling spot is a permanent investigation area containing up to 800 identified trees. The systematic identification of the trees was performed at the IRD herbarium in Cayenne where a voucher sample is deposited (Accessing No. Prévost 1120).¹⁴

Powdered trunk bark of *L. procera* was subjected to successive extractions with solvents of increasing polarity (cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol). The highest antiplasmodial activity was found for the cyclohexane fraction. This extract was fractionated by flash chromatography on silica gel using dichloromethane containing increasing amounts of methanol (0% to 10%). The antiplasmodial activity was concentrated in the fraction eluted with 1% to 3% of methanol. Further fractionation by successive flash chromatography on silica gel led to the isolation of the pure compounds Casearlucine A **1** and Caseamembrol A **2**. NMR and mass spectral data of compounds **1** and **2** were identical to those previously reported for

Casearlucine A (or Bucidasarin B) and Caseamembrol A,^{9,5,10} although compound **2** displayed a significantly higher optical rotation than the value reported for Caseamembrol A (reported for Casearmembrol A: $[\alpha]_D -8.3^\circ$ (c 0.38, MeOH), found for **2**: $[\alpha]_D -61^\circ$ (c 0.40, MeOH)). Laetiaprocerines A–D and Laetianolide A were obtained by further purification on reversed-phase semi-preparative HPLC.¹⁵

The structures of Laetiaprocerines A–D were determined by careful analysis of their NMR data, which are summarized in Tables 1 and 2. Laetiaprocerine C **5** (C₃₆H₄₆O₉, HRTOFESIMS) displayed ¹H and ¹³C spectra similar to those of the known Casearlucine A **1**, but showed additional signals assigned to a benzoic ester moiety. NMR data of **5** could be fully assigned as follows: the COSY spectrum allowed us to assign the two H₇ (1.75 and 1.98 ppm) through their correlation with H₆ (5.21 ppm). The signal at 1.98 ppm also showed a strong COSY correlation with a methyl doublet at 0.97 ppm. The H₇ signal at 1.75 ppm only showed a COSY correlation with its vicinal proton at 1.98 ppm. The proton signal of H₈ overlapped with H₇ at 1.98 ppm: the HSQC spectra showed that the signal at 1.98 ppm correlated with C₇ at 33.0 ppm and also with a carbon at 36.2 ppm, which could be assigned to C₈. This was confirmed by the HMBC correlations of the signal at 36.2 ppm with the methyl doublet at

Table 1. ¹H NMR data of 1–6^a

Protons	1	2	3	4	5	6
1a	1.92 m	1.70 m	1.93 m	1.99 m	2.01 m	1.83 m
1b	1.92 m	2.19 m	1.93 m	2.12 m	2.1 m	1.94 br d 15.2
2	5.46 m	5.63 m	5.46 m	5.48 m	5.48 m	5.53 m
3	6.02 dd 4.3–1.6	5.91 br s	5.96 dd 4.3–1.6	6.01 br d 4.3	6.02 br d 4.3	6.87 m
6	3.82 m	4.03 dd 12.0–3.7	3.33 dd 12.4–2.8	5.21 dd 12.1–4.0	5.21 dd 12.7–3.8	3.39 m
7a	1.63 m	1.65 m	1.46 q 12.8	1.75 m	1.75 m	1.77 m
7b	1.77 m	1.81 m	1.90 d 14.2	1.99 m	1.98 m	2.05 m
8	1.79 m	1.88 m	1.72 m	1.98 m	1.97 m	1.73 m
10	2.39 t 8.5	2.41 m	2.40 dd 9.5–7.5	2.51 dd 13.5–3.2	2.52 dd 14.3–7.2	2.49 dd 10.2–3.2
11a	1.70 m	1.68 m	1.70 d 16.4	1.81 d 17.2	1.81 d 17.8	1.76 m
11b	2.25 dd 16.9–8.3	2.25 dd 17.4–8.5	2.25 dd 16.8–8.6	2.31 dd 17.2–8.0	2.31 dd 17.5–7.8	2.27 dd 15.8–9.0
12	5.39 m	5.39 m	5.40 m	5.44 m	5.43 m	5.31 m
14	6.28 dd 17.3–10.7	6.33 dd 17.4–10.6	6.28 dd 17.4–10.7	6.33 dd 17.3–10.7	6.33 dd 17.3–10.7	6.39 dd 17.4–10.6
15a	4.95 d 10.7	4.97 d 10.6	4.94 d 10.6	4.98 d 10.7	4.98 d 10.7	4.95 d 10.6
15b	5.12 d 17.3	5.12 d 17.4	5.11 d 17.3	5.14 d 17.3	5.14 d 17.4	5.09 d 17.5
16	1.63 s	1.68 s	1.68 s	1.71 s	1.71 s	1.73 s
17	0.95 d 6.7	0.96 d 7.5	0.97 d 6.4	0.98 d 6.7	0.97 d 6.6	1.02 d 6.9
18	6.75 br s	6.72 br s	6.67 br s	6.56 br s	6.56 br s	9.38 s
19	6.53 s	6.49 s	6.5 s	6.81 s	6.81 s	10.42 s
20	0.83 s	0.87 s	0.82 s	0.87 s	0.89 s	0.85 s
2'	2.49 m	2.41 m	2.49 m	2.67 sept 7.0	2.50 m	2.46 m
3'a	1.59 m	1.53 m	1.57 m	1.24 d 6.9	1.59 m	1.53 m
3'b	1.72 m	1.72 m	1.72 m		1.73 m	1.70 m
4'	0.99 t 7.3	0.95 t 7.5	0.99 t 7.4		1.00 t 7.4	0.94 t 7.4
5'	1.20 d 6.9	1.18 d 7.0	1.20 d 6.96	1.25 d 6.9	1.21 d 7.0	1.17 d 6.9
Me-18	2.10 s	2.12 s	2.11 s	2.08 s	2.07 s	
Me-19	1.95 s	1.97 s	1.95 s	2.06 s	2.00 s	
2''						
3''				8.15 br d 8.2	8.15 br d 8.2	
4''				7.48 m	7.48 m	
5''				7.59 m	7.59 m	
OCH ₃			3.32 s			3.31 s

^a All spectra were recorded in CDCl₃, 500 MHz.

Table 2. ^{13}C NMR data of **1–6**^a

Carbon ^b	1	2	3	4	5	6
1	26.7	26.1	26.9	26.7	26.6	25.8
2	66.2	70.4	66.1	65.8	65.9	64.7
3	121.8	124.3	121.2	123.2	123.2	140.2
4	145.3	144.2	146.1	144.1	144.3	148.7
5	53.5	53.5	52.9	51.9	51.9	55.1
6	72.8	74.1	81.7	74.5	74.5	81.5
7	37.3	37.7	31.3	33.0	33.0	31.9
8	36.8	36.8	36.2	36.1	36.2	35.6
9	37.6	38.4	37.7	37.5	37.6	39.0
10	36.8	41.4	36.7	37.3	37.3	40.0
11	30.3	30.0	30.2	30.3	30.3	31.3
12	129.0	128.7	129.3	128.9	128.9	126.7
13	135.7	135.9	135.5	135.8	135.9	136.6
14	141.2	141.1	141.3	141.2	141.2	141.6
15	111.0	111.1	110.9	111.2	111.2	110.7
16	11.9	12.0	11.9	12.0	12.0	12.3
17	15.5	15.6	15.7	15.4	15.4	15.7
18	95.6	95.1	96.2	95.3	95.3	191.2
19	97.0	96.6	97.5	97.5	97.5	202.2
20	24.9	25.0	25.1	25.1	25.0	25.2
1'	175.9	176.5	176.0	176.3	175.8	176.0
2'	41.1	41.1	41.1	34.0	41.1	40.9
3'	26.9	26.8	27.1	18.7	27.0	27.0
4'	11.6	11.7	11.6		11.7	11.6
5'	16.6	16.5	16.6	19.1	16.6	16.3
OCO ₁₈	170.1	170.2	170.3	170.0	170.0	
MeCO ₁₈	21.2	21.2	21.3	21.1	21.1	
OCO ₁₉	169.4	169.5	169.5	169.6	169.5	
MeCO ₁₉	21.5	21.6	21.7	21.7	21.7	
1''				165.7	165.7	
2''				129.4	129.5	
3''				129.9	129.9	
4''				133.5	133.5	
5''				133.5	133.5	
OCH ₃			57.5			57.2

^a All spectra were recorded in CDCl₃, 125 MHz.

^b The J_{mod} experiment allowed us to distinguish between CH₂/C and CH₃/CH.

0.97 ppm and a methyl singlet at 0.89 ppm. So we assigned H₈ and C₈ (1.98–36.2 ppm), and H₁₇ and C₁₇ (0.97–15.4 ppm). The methyl singlet at 0.89 ppm (carbon at 25.0 ppm) showed HMBC correlations with C₇, C₈ and signals at 37.3, and/or 37.6 ppm: it could therefore be assigned as H₂₀, the signal at 37.6 ppm being C₉. The conjugated double bond system could be unambiguously identified with COSY correlations (between H_{15a}, H_{15b}, and H₁₄), HMBC correlations (C₁₄/H₁₆–C₁₄/H₁₂–C₁₃/H₁₅–C₁₃/H₁₆–C₁₃/H₁₁), and NOESY correlations (H_{15b}/H₁₆–H_{15a}/H₁₄–H₁₄/H₁₂–H₁₁/H₁₆). Proton H₁₁ (2.31 ppm) showed HMBC correlations with 25.0, 36.2 ppm (C₈), 37.3 and/or 37.6 ppm, which confirmed the assignment of H₂₀ and C₂₀ (0.89–25.0 ppm), and C₉ (37.6 ppm). The carbon at 37.3 ppm bore a proton at 2.52 ppm, which showed HMBC correlations with C₁₁, C₈, C₉, and C₆. Signals at 2.52–37.3 ppm could be therefore assigned as H₁₀–C₁₀. Other HMBC correlations of H₁₀ with carbons at 26.6, 51.9, 65.9, and 97.5 ppm allowed us to assign these signals to C₁–C₅–C₂–C₁₉, respectively. This assignment was confirmed by the COSY (H₁₀/H_{1a}–H₁₀/H_{1b}–H₂/H_{1a}–H₂/H_{1b}) and the HMBC (C₅/H₆–C₅/H₁₉) correlations. An ethylenic proton at 6.02 ppm displayed HMBC correlations with C₁ and C₅. Proton H₂ also showed COSY correlation

with this ethylenic proton allowing us to assign H₃ and C₃ (6.02–123.2 ppm). HMBC correlations of H₃ with signal at 95.3 ppm and of H₂ with signals at 144.3 and 175.8 ppm allowed us to assign H₁₈ and C₁₈ (6.56–95.3 ppm), C₄ (144.3 ppm), and the carbonyl C_{1'} (175.8 ppm). The secondary butyl side chain was assigned thanks to the HMBC (C₂/H_{2'}–C₂/H_{3'a}–C₂/H_{3'b}–C₂/H_{5'}) and the COSY data (H_{2'}/H_{5'}–H_{2'}/H_{3'a}–H_{2'}/H_{3'b}–H_{4'}/H_{3'a}–H_{4'}/H_{3'b}). HMBC correlation of H₆ with 165.7 ppm showed that C₆ bears an ester (C_{1''} at 165.7 ppm). HMBC correlations of the aromatic signals at 7.48 ppm and 8.16 ppm with this carbonyl indicated that it belongs to a benzoic ester. HMBC and COSY spectra also allowed the assignment of these aromatic signals. H₁₉ showed HMBC correlation with the carbon at 169.5 ppm (OCO₁₉) and the methyl carbon at 21.7 ppm (Me-19). H₁₈ showed HMBC correlation with the carbon at 170.0 ppm (OCO₁₈) and the methyl at 21.1 ppm (Me-18). All these data allowed us to assign the structure **5** to this new compound, Laetiaprocerine C.

Laetiaprocerine A **3** (C₃₀H₄₄O₈, HRTOFESIMS) differed from Casearlucine A **1** by an additional methyl (3.32 ppm; 57.5 ppm). These data indicated that **3** bears

a methoxy group. The chemical shifts of C₆ and H₆ in compound **3** indicated that this methoxy group is on C₆. This hypothesis was fully supported by the 2D NMR spectral analysis of compound **3**. Laetiaprocerine D **6** (C₂₆H₃₈O₅, HRTOFESIMS) and Laetiaprocerine A **3** displayed similar NMR data although signals of acetate and methylendioxy groups disappeared and were replaced by two aldehyde groups on C₁₈ and C₁₉. Other 2D NMR were in agreement with the structure **6** proposed for this new compound. Laetiaprocerine B **4** (C₃₅H₄₄O₉, HRTOFESIMS) was close to compound **5**: it showed an additional methyl signal (1.24 ppm, d, *J* = 6.9 Hz), but also absence of the methyl triplet (1.0 ppm) and of the methylene multiplets (1.59 and 1.73 ppm) observed in **5**. These data suggest that **4** bears an isobutanoyloxy moiety instead of a 2-methylbutanoyloxy group. The location of this group at C₂ was indicated by the HMBC correlations (H₂/C_{1'}-H₂/C₁-H₃/C₁).

The relative stereochemistry of the new clerodane diterpenoids **3–6** was determined by a NOESY experiment. The configuration of the double bond between C₁₂ and C₁₃ was the same for all clerodane diterpenoids described in this paper: a strong NOE effect between H₁₂ and H₁₄ indicated an *E* configuration. Laetiaprocerine A **3** (Fig. 2): NOE effects between H₁₀ and H₂₀, and H₁₀ and H₁₂ indicated that H₁₀ is equatorial for the A ring. Therefore, the junction between C₁₀ and C₁ is axial, and a NOE effect between H₁ and H₂₀ indicated an equatorial position for C₂₀. NOE effect between H₁₁ and H₁₇ showed an equatorial position for C₁₇, and coupling constants are those of an axial H₆. If the C₁-C₁₀ bond is axial, then the C₅-C₄ bond should be equatorial, and C₅-C₁₈ is axial, anti to H₆. This was confirmed by the NOE effect between H₁₁ and H₁₉. The assignment of the stereochemistry at C₂ was made difficult by the overlapping of the signals of the two H₁, and the lack of significant NOE effect for H₂. However, H₂ and C₂ displayed the same chemical shifts in compounds **3** and **1**, and were different from those of compound **2**. So we assumed that the relative stereochemistry at C₂ was the same in both compounds **3** and **1**. Laetiaprocerine B **4** and Laetiaprocerine C **5** showed an ambiguous NOE effect between H₁ and H₂₀. However, the axial position of the unsaturated side chain at C₉ could be deduced from the NOE effect between H₁₁ and H₁₉. One H₁ correlated with the axial H₆ and H₂ indicating the

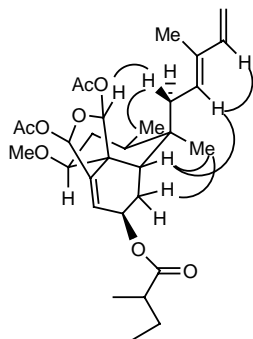


Figure 2. Key NOESY for Laetiaprocerine A.

same stereochemistry at C₂ as in compound **1**. Laetiaprocerine D **6** showed NOESY correlations allowing stereochemistry assignment at C₂: there was a NOE effect between H_{1a} and H₆, so H₆ is axial (this was not obvious from the coupling constants) and ring B could be considered as a pseudo chair. Both H₁ showed NOESY correlation with H₂, which could therefore be assigned as pseudo equatorial. The other NOE effects of **6** were comparable to those of **3**.

We also tried to determine the absolute configuration of Casearlucine A **1** and Caseamembrol A **2**, which remained unknown. We used the modified Mosher's ester method described by Latypov et al.¹⁶ and previously used by Prakash et al. on similar clerodane diterpenoids.⁹ Acylation of **1** and **2** with (*R*)-MPA yielded the *R*-diesters **1R** and **2R**, and acylation with (*S*)-MPA gave the *S*-diesters **1S** and **2S**. The $\Delta\delta^{RS}$ obtained are summarized in Table 3. The results were similar to those obtained by Prakash et al. especially for H₁₈, but we disagree with their conclusions on the *R* absolute configuration at C₆. On the molecular models of **1R** and **1S**, when the aryl ester moiety adopts the conformation described in the literature as the most stable,¹⁶ H₁₈ should be shielded in compound **1S** only if C₆ is *S* (Fig. 3). This absolute stereochemistry obtained for Casearlucine A and Caseamembrol A is identical to that obtained by Beutler et al. by X-ray crystallography (anomalous dispersion) for a similar clerodane diterpenoid, Casearborin E.⁷ It is also identical to that obtained for Casearin C by chemical derivatization and circular dichroism spectroscopy by Itokawa et al.¹¹ This experiment confirmed that H₆ was axial on **1**: the coupling constants for H₆ on **1R** and **1S** were clearly those of an axial proton, which was not obvious on the ¹H NMR of **1**. Moreover, the ¹H NMR spectrum of each of the four acylation reaction crude extracts showed only one diastereoisomer, which tended to prove that **1** and **2** were optically pure. The absolute stereochemistry of Laetiaprocerine C **5** was determined by chemical correlation: benzylation of **1** gave a compound identical to **5** (TLC, ¹H NMR, optical rotation) and thus both compounds have the same absolute configuration.

The structure of the new butanolide **7** (C₂₁H₃₈O₃, HREIMS) was established as follows. Spectral data of this compound were compared to those of the (2*R*,3*S*,4*S*)-3-hydroxy-4-methyl-2-(1'-*n*-hexadec-7'-(*Z*)-enyl)butanolide isolated from *Trichilia clausenii*.¹⁷ ¹H, ¹³C NMR spectra were slightly different, and NMR signal assignment was made as follows: signals at 2.55, 4.20, and 4.65 ppm showed HMBC correlation with the carbonyl at 177.7 ppm. On the COSY

Table 3. δ and $\Delta\delta^{RS}$ values for the (*R*) and (*S*) MPA esters **1R**, **1S**, **2R** and **2S**^a

	δ 1R	δ 1S	$\Delta\delta^{RS1}$	δ 2R	δ 2S	$\Delta\delta^{RS2}$
H ₁₈	6.59	6.00	0.59	6.57	6.02	0.55
H ₁₉	6.48	6.59	-0.11	6.42	6.55	-0.13
H ₃	6.01	5.83	0.18	5.90	5.73	0.17
H ₂	5.44	5.35	0.09	5.60	5.54	0.06

^a All spectra were recorded in CDCl₃, 250 MHz.

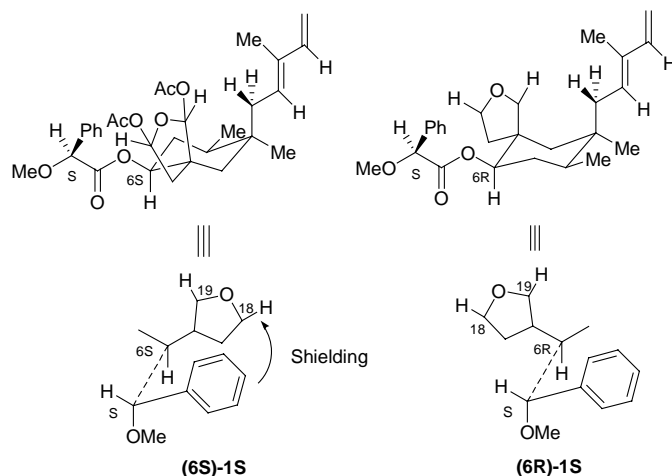


Figure 3. Comparison of shielding effect on H₁₈ for (6*S*)-1*S* and (6*R*)-1*S* (partial structures).

spectrum, the signal at 4.20 ppm correlated with 2.55 ppm and 4.65 ppm. The signal at 4.65 ppm also correlated with a methyl doublet at 1.42 ppm. Signals at 2.55, 4.20, 4.65, and 1.42 ppm could be assigned to H₂, H₃, H₄, and Me-4, respectively. H₂ correlated with signals at 1.58 and 1.75 ppm, carried by a carbon at 28.6 ppm assigned to H_{1'} and C_{1'}. This carbon is the first of an unsaturated fatty side chain. The position of the double bond on the chain was given by DMDS derivatization.¹⁸ EI mass spectrum of the DMDS adduct gave a molecular pic at 432, and two fragment ions at 259 and 173. The coupling constant (10.8 Hz) between the two ethylenic protons was measured, while the allylic proton signal at 2.03 ppm was suppressed by irradiation, thus allowing us to assign the *Z* configuration for this double bond. The relative stereochemistry of the lactone ring was found by applying the rule described by Chaves and Roque:¹⁹ C_{1'} around 27 ppm indicated a fatty side chain *trans* to the hydroxyl at C₃, and C_{Me-4} around 13 ppm indicated a methyl *cis* to the the same hydroxyl. This was confirmed by the NOESY spectrum, indicating NOE effects between Me-4 and H₂, H₃ and H₄, and H₃ and H_{1'}.

The clerodane diterpenoids exhibited mild antiplasmodial, leishmanicidal and cytotoxic activities when tested in vitro and the butanolide could be considered as inactive (Table 4).²⁰ Our compounds displayed antimalarial and cytotoxic activities close to activities previously reported for similar compounds.^{3,5} Compounds **1**, **2**, and **3** were more active than **4**, **5**, and **6**, so bulky substituents on C₆, and the hydrolysis of the diacetal lowered biological activity. The effect of bulky substituents on C₆ was striking for the leishmanicidal activity: the most efficient compounds against *L. amazonensis* (IC₅₀ around 10 μM) were **1** and **2**, while **4** and **5** were inactive. In compounds **4** and **5**, the benzoic ester at C₆ led to steric hindrance around C₁₈ and C₁₉ which are two electrophilic centers. Therefore, nucleophilic attack on C₁₈ or C₁₉ might be responsible for the antileishmanial activity of such compounds. The antiplasmodial activities of the diastereoisomers **1** and **2** were equivalent and similar to that of **3**, while the latter was less cytotoxic. The ether substitution on C₆ could explain this difference. However, none of these compounds seemed to have specific antiparasitic activity, but they should be good candidates for further investigation as cytotoxic agents.

Table 4. Biological activities (μM) of the clerodane diterpenoids **1–6** and the butanolide **7**²⁰

	<i>P. falciparum</i>		<i>L. amazonensis</i>		Human cells MCF7 (3)	CAR ^a
	F-32 (2) ^b	FcB1 (3)	Axenic amastigotes (2)	Promastigotes (2)		
1	0.62 ± 0.03 ^c	0.54 ± 0.05	5.98 ± 6.8	11.1 ± 0.2	1.54 ± 0.88	2.2
2	0.57 ± 0.04	0.59 ± 0.02	10.5 ± 0.4	11.0 ± 0.2	0.85 ± 0.21	1.3
3	0.58 ± 0.03	0.66 ± 0.08	47.4 ± 29.8	10.9 ± 0.1	4.38 ± 0.29	6.8
4	4.44 ± 0.46	6.08 ± 1.46	> 200	> 200	17.8 ± 1.71	3.1
5	4.66 ± 0.23	5.35 ± 0.94	> 200	> 200	27.3 ± 4.25	4.6
6	6.04 ± 0.66	3.79 ± 0.71	30.3 ± 0.5	50.9 ± 37.6	9.60 ± 2.16	2.7
7	57.6 ± 10.4	27.5 ± 4.51	129 ± 7.1	111 ± 34.7	65.9 ± 32.4	2.1
CQ ^d	60 × 10 ⁻³	145 × 10 ⁻³	ND	ND	ND	ND
AmB ^e	ND	ND	0.3	0.3	ND	ND
Dox ^f	ND	ND	ND	ND	0.4	ND

^a CAR cytotoxic/antiplasmodial (FcB1) ratio.

^b Number of independent experiments.

^c Means ± SD.

^d CQ, chloroquine; positive control for *P. falciparum* inhibition.

^e AmB, amphotericin B; positive control for *Leishmania* inhibition.

^f Dox, doxorubicin; positive control for MCF7 inhibition.

Acknowledgments

This work was supported by the ACI Pal+, French Ministry of Research. We thank Dr. Christian Moretti (US 084 Biodival, IRD) for organizing the plant supply and for fruitful discussions.

References and notes

- Gibboms, S.; Gray, A. I.; Waterman, P. G. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 635.
- Beutler, J. A.; McCall, K. L.; Herbert, K.; Johnson, T.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 233.
- Kanokmedhakul, S.; Kanokmedhakul, K.; Kanarsa, T.; Buayairaksa, M. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 183, and references cited.
- Shen, Y.-C.; Lee, C. L.; Khalil, A. T.; Cheng, Y.-B.; Chien, C.-T.; Kuo, Y.-H. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 68, and references cited.
- Hayashi, K.-I.; Nakanishi, Y.; Bastow, K. F.; Cragg, G.; Nozaki, H.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 345.
- Oberlies, N. H.; Burgess, J. P.; Navarro, H. A.; Pinos, R. E.; Soejarto, D. D.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Wani, M. C.; Wall, M. E. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 497.
- Beutler, J. A.; McCall, K. L.; Herbert, K.; Herald, D. L.; Pettit, G. R.; Johnson, T.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 657.
- Oberlies, N. H.; Burgess, J. P.; Navarro, H. A.; Pinos, R. E.; Fairchild, C. R.; Peterson, R. W.; Soejarto, D. D.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Wani, M. C.; Wall, M. E. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 95.
- Sai Prakash, C. V.; Hoch, J. M.; Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 100.
- Shen, Y.-C.; Wang, L.-T.; Wang, C.-H.; Khalil, A. T.; Guh, J.-H. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 108.
- Itokawa, H.; Totsuka, N.; Morita, H.; Takeya, K.; Itaka, Y.; Schenkel, E. P.; Motidome, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 3384.
- Hunter, M. S.; Corley, D. G.; Carron, C. P.; Rowold, E.; Kilpatrick, B. F.; Durley, R. C. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 894.
- Espindola, L. S.; Rosy e Vasconcelos Júnior, J.; de Mesquita, M. L.; Marquié, P.; de Paula, J. E.; Mambu, L.; Santana, J. M. *Planta Med.* **2004**, *70*, 1093.
- We worked on the bark of two different trees. Interestingly, one tree (N° 424, diameter 23 cm, collected in January 2003) gave compounds **1** and **2** as the major compounds, with small amounts of **3** and **7**, whereas the other (N° 1003, diameter 43 cm collected in March 2003) gave **3** and **7** as the main compounds, with small amounts of **1**, **4**, **5** and **6**.
- Structural data. Laetiaprocerine A (**3**): $[\alpha]_D^{+48.5^\circ}$ (*c* 0.33, MeOH); HRTOFESIMS *m/z* 555.2939 (MNa⁺, calcd for C₃₀H₄₄O₈Na : 555.2934, +0.9 ppm); IR (KBr) 2970, 2937, 2879, 1754, 1730, 1460, 1373, 1230. Laetiaprocerine B (**4**): $[\alpha]_D^{+133^\circ}$ (*c* 0.40, MeOH); HRTOFESIMS *m/z* 631.2874 (MNa⁺, calcd for C₃₅H₄₄O₉Na: 631.2883, -1.4 ppm); IR (KBr) 2966, 2928, 2870, 1752, 1719, 1451, 1371, 1272, 1254, 1224. Laetiaprocerine C (**5**): $[\alpha]_D^{+89^\circ}$ (*c* 0.33, MeOH); HRTOFESIMS *m/z* 645.3015 (MNa⁺, calcd for C₃₆H₄₆O₉Na: 645.3040, -3.9 ppm); IR (KBr) 2969, 2937, 2878, 1757, 1726, 1452, 1372, 1273, 1226. Laetiaprocerine D (**6**): $[\alpha]_D^{+102^\circ}$ (*c* 0.43, MeOH); HRTOFESIMS *m/z* 453.2613 (MNa⁺, calcd for C₂₆H₃₈O₅Na: 453.2617, -0.8 ppm); IR (KBr) 2969, 2935, 2878, 1730, 1638, 1460, 1376. Laetianolide A (**7**): $[\alpha]_D^{-32^\circ}$ (*c* 0.58, MeOH); HREIMS *m/z* 338.28219 (M⁺, calcd for C₂₁H₃₈O₃: 338.28209, +0.3 ppm); IR (KBr) 2925, 2854, 1756, 1464, 1340, 1189; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) 5.36 (2H, m, ethylenic); 4.64 (1H, m, H₄); 4.22 (1H, dd, *J* = 4.6–3.8 Hz, H₃); 2.55 (1H, m, H₂); 2.03 (4H, m, allylic); 1.75 (1H, m, H_{1'}); 1.61 (1H, m, H₁); 1.50 (2H, m, CH₂ fatty chain); 1.42 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, Me-4); 1.40–1.25 (18H, m, CH₂ fatty chain); 0.90 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₃ fatty chain). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) 177.7 (C₁); 130.3–129.8 (ethylenics); 78.3 (C₄); 74.4 (C₃); 49.4 (C₂); 32.1–29.9–29.8–29.7–29.5–29.2 (CH₂, fatty chain); 28.6 (C_{1'}); 27.4 (allylic); 22.9 (CH₂ fatty chain); 14.3 (Me-4); 14.1 (CH₃ fatty chain).
- Latypov, Sh. K.; Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8569.
- Pupo, M. T.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F. G. F. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 307.
- Mansour, M. P.; Holdsworth, D. G.; Forbes, S. E.; Macleod, C. K.; Volkman, J. K. *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 659, and references cited.
- Chaves, M. H.; Roque, N. F. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 523.
- Plasmodium falciparum* was cultured according to the method described by Trager and Jensen,^{20a} with modifications.^{20b} Cultures were synchronized by 5% D-sorbitol lysis (Merck, Darmstadt, Germany).^{20b} F32 Tanzania was considered as a chloroquine-sensitive strain (chloroquine IC₅₀: 60 ± 12 nM, <100 nM), FcB1-Columbia was considered as a chloroquine-resistant strain (chloroquine IC₅₀: 145 ± 11.2 nM). In vitro antimalarial activity was evaluated by [³H]hypoxanthine (ICN, France) incorporation as already described by Desjardins et al.^{20c} Incubation time between parasite culture and the drugs was 48 h. The cytotoxicity of the drugs was estimated on human breast cancer cells (MCF7). Cell lines were cultured in the same conditions as *P. falciparum*, except for the 5% human serum which was replaced by 5% fetal calf serum (Boehringer). After addition of drugs at various concentrations, cell growth was estimated by [³H]hypoxanthine incorporation after 48 h incubation.^{20d} The antileishmanial (*Leishmania amazonensis*) activity against promastigote and axenic amastigote was determined after 72 h incubation by a colorimetric method based on the reduction of tetrazolium salt (MTT, Sigma)^{20e} (a) Trager, W.; Jensen, J. B. *Science* **1976**, *193*, 673; (b) Benoit, F.; Valentin, A.; Péliissier, Y.; Marion, C.; Dakuyo, Z.; Mallié, M.; Bastide, J.-M. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1995**, *89*, 217; (c) Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710; (d) Valentin, A.; Benoit-Vical, F.; Moulis, C.; Stanislas, E.; Mallié, M.; Fourasté, I.; Bastide, J.-M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2305; (e) Sereno, D.; Lemesre, J.-L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 972.