

N° D'ORDRE : **2498**

# THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE  
DE TOULOUSE**

**SPECIALITE : Sciences des Agroressources  
Option : Pharmacognosie**

par

**Vincent ROUMY**

**ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DE PLANTES  
AMAZONIENNES D'ACTIVITÉ  
ANTIPLASMODIALE, DONT *PSEUDOXANDRA  
CUSPIDATA* Maas ET *TAPIRIRA GUIANENSIS*  
Aubl.**

Soutenance le **9 juillet 2007** à devant le Jury composé de :

M <sup>me</sup> .	E. BORREDON, Professeur à l'ENSIACET, Toulouse	Président
M.	F. BAILLEUL, Professeur, Lille 2	Rapporteur
M.	C. MORETTI, Directeur IRD d'Orleans	Rapporteur
M <sup>me</sup> .	J. QUETIN- LECLERCQ, Professeur, Université Catholique de Louvain	Examineur
M <sup>me</sup> .	I. FOURASTE, Professeur émérite, UPS Toulouse	Examineur
M.	C. MOULIS, Professeur, UPS Toulouse	Examineur

Directeur des Travaux de Recherche : Pr. C. MOULIS

Laboratoire "Pharmacochimie des substances naturelles et pharmacophores redox", UMR  
152, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, UPS, 31062 Toulouse,  
35, chemin des Maraîchers - France.

*A mes parents.*

*A Andrea-luz et Raphaël Gutierrez-  
Choquevilca.*

*A mon fils*

*S'il se rencontre des plantes et des fleurs maladroites ou malchanceuses, il n'en est point qui soient entièrement dénuées de sagesse et d'ingéniosité. Toutes s'évertuent à l'accomplissement de leur œuvre ; toute ont la magnifique ambition d'envahir et de conquérir la surface du globe en y multipliant à l'infini la forme d'existence qu'elles représentent. Pour atteindre ce but, elles ont, à raison de la loi qui les enchaîne au sol, à vaincre des difficultés bien plus grandes que celles qui s'opposent à la multiplication des animaux. Aussi la plupart, ont-elles recours à des ruses, à des combinaisons, à une machinerie, à des pièges, qui, sous le rapport de la mécanique, de la balistique, de l'aviation, de l'observation des insectes, par exemple, précédèrent souvent les inventions et les connaissances de l'homme.*

Maeterlinck M.

# ABREVIATIONS ET SYMBOLES

## Abréviations

AcOEt	acétate d'éthyle
AcONa	acétate de sodium
Ag NO <sub>3</sub>	nitrate d'argent
ATP	adénosine triphosphate
ButOH	butanol
CCM	chromatographie sur couche mince
CCMP	chromatographie sur colonne sous moyenne pression
CLHP	chromatographie liquide haute performance
<i>b</i>	large
CD <sub>3</sub> OD	méthanol deutéré
CDCl <sub>3</sub>	chloroforme deutéré
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	dichlorométhane
CH <sub>3</sub> OH ou MeOH	méthanol
CHCl <sub>3</sub>	chloroforme
COSY	correlated spectroscopy
CPC	chromatographie de partage centrifuge
Cq	carbone quaternaire
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet dédoublé
<i>ddd</i>	doublet dédoublé dédoublé
<i>dt</i>	doublet de triplet
DMSO	diméthyle sulfoxyde
DMSO- <i>d</i> 6	diméthyle sulfoxyde deutéré
ESI	spectrométrie de masse par électrospray
G6PDH	glucose 6-phosphate déshydrogénase
Hept	Heptane
Hex	hexane
HMBC	heteronuclear multiple bond connectivity
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IR	infra rouge
K	kelvin
LDH	lactate déshydrogénase
<i>m</i>	multiplet
Na	sodium
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NaOH	hydroxyde de sodium
NOESY	nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
<i>qd</i>	quadruplet
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMN <sup>1</sup> H	résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ( <i>J</i> <sub>MOD</sub> ) <sup>13</sup> C	résonance magnétique nucléaire du carbone 13 en <i>J</i> modulé
<i>s</i>	singulet
Si	silice
<i>t</i>	triplet
Tol	toluène
u.m.a.	unité de masse atomique
UV	ultraviolet

## Symboles

Hz	hertz
$J$	constante de couplage exprimée en Hz
$J_{\text{gem}}$	constante de couplage géminale
$J_{\text{vic}}$	constante de couplage vicinale
m/z	masse/charge d'un ion
ppm	partie par million
$\delta$	déplacement chimique exprimé en ppm
$\lambda_{\text{max}}$	longueur d'onde d'absorption maximale

## Définitions

« Pharmacopée »	dans ce travail, le terme « pharmacopée traditionnelle» ne désigne pas seulement un recueil écrit mais un ensemble de matières médicales issu d'une tradition orale ou écrite.
« Remède »	tous ce qui peut servir à combattre ou prévenir une maladie.

À notre Président de Thèse,

Madame Borredon,  
Professeur à l'École Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques de Toulouse.

Nous vous remercions vivement d'avoir accepté de juger ce travail.  
Nous sommes particulièrement honoré de vous avoir vu assurer la Présidence de ce Jury de Thèse.

À notre Jury de Thèse,

Monsieur Bailleul,  
Professeur de Pharmacognosie de l'Université de Lille 2.

Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous avez fait d'être le rapporteur de ce travail.  
Nous sommes très honoré d'avoir bénéficié de vos remarques et corrections et tenons à vous assurer de notre grande estime et de notre profonde gratitude.  
Nous sommes également très reconnaissant de la confiance que vous avez témoigné en notre travail puisqu'elle a permis de fonder les débuts d'une très intéressante collaboration.

Monsieur Moretti,  
Directeur de l'Institut pour la Recherche et le Développement d'Orléans.

Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous avez fait d'être le rapporteur de ce travail.  
Nous vous remercions pour l'ensemble de vos remarques et de vos réflexions ainsi que pour votre disponibilité qui nous a permis de partager d'enrichissantes conversations.

Madame Quetin-Leclercq,  
Professeur de Pharmacognosie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Catholique Louvain, Belgique.

Soyez convaincu de notre profonde gratitude pour avoir accepté de juger ce travail.  
Nous tenons à vous dire le plaisir que nous a procuré votre présence, en ce jour.

Monsieur le Professeur Claude MOULIS,  
Professeur de Pharmacognosie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Paul Sabatier de Toulouse.

Vous nous avez fait profiter, tout au long de ce travail, de vos compétences.  
Nous tenons à vous présenter notre profonde reconnaissance et notre respect et à vous assurer de notre amitié.  
Nous vous sommes également infiniment reconnaissant du dévouement dont vous avez fait preuve pour maintenir les différents contrats de recherches qui ont financé ce travail scientifique, ainsi que pour la liberté d'action que vous nous avez autorisé.

Madame Fourasté

Professeur émérite de Pharmacognosie à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Paul Sabatier de Toulouse.

Vous nous avez fait profiter, tout au long de ce travail, de vos compétences, notamment dans le domaine passionnant de la botanique, apanage précieux du pharmacogyste.

Nous tenons à vous présenter notre profonde reconnaissance et notre respect et à vous assurer de notre amitié.

Nous vous sommes également infiniment reconnaissant du dévouement dont vous avez fait preuve pour défendre ce travail et pour avoir mis en œuvre les différents contrats de recherches qui ont financé ce travail scientifique, ainsi que pour la liberté d'action que vous nous avez autorisé.

Enfin, nous remercions tout particulièrement :

Monsieur Nicolas Fabre, qui a eu la patience de prendre en charge notre apprentissage de l'analyse structurale.

Madame Sèverine Maurel, grâce à qui la majorité des tests biologiques a pu être réalisée et qui a également eu la patience de nous enseigner les techniques employées.

Madame Valérie Christofoli, secrétaire aquariophile mais également, une amie, qui a largement contribué à la mise en forme de notre travail.

Mademoiselle Valérie Jullian, incontournable experte en phytochimie sans oublier ses talents en hôtellerie et en danse moderne...

Andrea-Luz Gutierrez Choquevilca, Lastenia Ruiz, Juan Ruiz de la UNAP à Iquitos ainsi que les membres des communautés de Kapawari Yacu, Soplín, Sabalo Yacu, qui ont permis la réalisation de notre enquête ethnopharmacologique.

L'ensemble des doctorants avec lesquels nous avons partagé cette expérience commune, Bénédicte Portet, Amélie Lhuillier, Céline Peirs, Lucia Acebey...

Messieurs Vedrenne et Lavedan, pour la réalisation des spectres de RMN.

L'ensemble des membres de l'UMR 152 (Mohamed, Péggi, Florence, Rémi, Edouard, Alexi ...).

# SOMMAIRE

<b>A</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>p.1</b>
<b>B</b>	<b>GÉNÉRALITÉS .....</b>	<b>p.2</b>
<b>1.</b>	<b>Généralités sur l’histoire du paludisme .....</b>	<b>p.3</b>
	<b>1.1. Historique du genre <i>Plasmodium</i></b>	
	<b>1.2. Historique du paludisme chez l’homme</b>	
	<b>1.2.1. Dans le monde</b>	
	<b>1.2.2. Concernant les Amériques</b>	
	<b>1.3. Histoire de la thérapeutique anti-paludique en Europe</b>	
<b>2.</b>	<b>Généralités sur la biologie du <i>Plasmodium</i>.....</b>	<b>p.7</b>
	<b>2.1. Cycle et biologie du <i>Plasmodium</i></b>	
	<b>2.1.1. Classification</b>	
	<b>2.1.2. Cycle biologique</b>	
	2.1.2.1. Cycle sexué chez l’anophèle femelle	
	2.1.2.2. Cycle asexué chez l’homme	
	<b>2.2. Description de la maladie</b>	
	<b>2.2.1. Accès de primo-invasion</b>	
	<b>2.2.2. Fièvre tierce bénigne</b>	
	<b>2.2.3. Formes cliniques</b>	
	2.2.3.1. Paludismes à <i>Plasmodium ovale</i> et <i>vivax</i>	
	2.2.3.2. Paludisme à <i>Plasmodium malariae</i>	
	2.2.3.3. Paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i>	
	2.2.3.4. Complications générales aux quatre espèces	
	<b>2.2.4. Protections individuelles contre les formes graves de paludisme</b>	
	<b>2.3. Traitements curatifs du paludisme</b>	
	<b>2.3.1. Les cibles plasmodiales des médicaments</b>	
	<b>2.3.2. Modes d’action des principaux anti-paludiques actuels</b>	
	2.3.2.1. Les schizonticides électifs (sanguins et tissulaires)	
	2.3.2.2. Les inhibiteurs des acides nucléiques	

## **C SÉLECTION DE PLANTES D'AMAZONIE TESTÉES SUR *P. FALCIPARUM***

- 1. Plantes issues de la médecine traditionnelle guyanaise ..... p.16**
  - Généralités sur la Guyane française**
  - Sélection des plantes**
  - Activité antiplasmodiale des plantes sélectionnées (test LDH)**
  
- 2. Plantes issues de la médecine péruvienne (Quechua) ..... p.24**
  - 2.1. Présentation des groupes ethniques étudiés**
    - 2.1.1. Contexte général**
    - 2.1.2. Contexte culturel**
      - 2.1.2.1. Conception de la médecine et de la maladie chez les Quechua  
d'Amazonie
      - 2.1.2.2. Les plantes utilisées par les Quechua
    - 2.1.3. Méthode d'enquête ethnopharmacologique**
  - 2.2. Monographies simplifiées des plantes étudiées**
  - 2.3. Extractions et activités biologiques**
  - 2.4. Conclusion**

## **D ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE BIOGUIDÉE DE *PSEUDOXANDRA CUSPIDATA* Maas.**

- 1. Description botanique ..... p.50**
  - 1.1. Situation phylogénique**
  - 1.2. Classification**
  - 1.3. Description et usage traditionnel**

- 1.4. Description de la poudre d'écorce de *P. cuspidata*
- 1.5. Anatomie de l'écorce (section transversale)
2. Description phytochimique du genre *Pseudoxandra* ..... p.58
  - 2.1. Les bisbenzylisoquinoléines
  - 2.2. Les séco-bisbenzylisoquinoléines
  - 2.3. Les benzylisoquinoléines
  - 2.4. Les aporphines
3. Extractions alcaloïdiques de *Pseudoxandra cuspidata* ..... p.61
  - 3.1. Première série d'extraction
  - 3.2. Deuxième série d'extraction
4. Identification des composés isolés de *Pseudoxandra cuspidata* p.67
  - 4.1. Identification du composé 1 (A'')
  - 4.2. Identification du composé 2 (IIE<sub>2</sub>)
  - 4.3. Identification du composé 3 (IID<sub>2</sub>)
  - 4.4. Identification du composé 4 (IIC<sub>3</sub>)
5. Activité anti-paludique des composés isolés de *P. cuspidata*..... p.90
  - 5.1. Activité *in vitro*
  - 5.2. Activité *in vivo* de la rodiasine (test de Peters)

## **E ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE BIOGUIDÉE DE *TAPIRIRA GUYANENSIS* Aubl.**

1. Description botanique ..... p.95
  - 1.1. Situation phylogénique
  - 1.2. Classification

- 1.3. Description
- 1.4. Anatomie de la poudre d'écorce
- 1.5. Anatomie d'une section transversale d'écorce
- 1.6. Utilisations traditionnelles
  
2. Description phytochimique du genre *Tapirira* ..... p.105
  - 2.1. Les triterpènes
  - 2.2. Les alkyl férulates
  - 2.3. Les flavonoïdes
  - 2.4. Les cyclohexénones
  - 2.5. Les alkyl-phénols
  
3. Extractions réalisées sur *T. guianensis* ..... p.108
  - 3.1. Première série d'extraction
  - 3.2. Deuxième série d'extraction
  
4. Identification des composés isolés de *Tapirira guianensis* ..... p.111
  - 4.1. Partie structurale commune aux quatre molécules isolées
  - 4.2. Identification des composés 1a et 1b
  - 4.2. Identification du composé 2
  - 4.3. Identification du composé 3
  
5. Activité biologique des composés isolés de *T. guianensis* ..... p.132
  - 5.1. Rappels sur la leishmaniose
  - 5.2. Activités antiplasmodiale, anti-leishmanienne et anti-bactérienne des quatre composés isolés de *T. guianensis*

## **F DISCUSSION ET CONCLUSION**

- 1. Sélection botanique et chimique des substances actives par bioguidage ..... p.137**
  - 1.1. Intérêts du bioguidage**
  - 1.2. Limites du bioguidage**
    - 1.2.1. Limites du bioguidage inhérent à la purification des principes actifs**
    - 1.2.2. Limites du bioguidage induites par les tests biologiques**
    - 1.2.3. Conclusions sur la recherche d'anti-paludiques par bioguidage *in vitro***
- 2. Résultats obtenus ..... p.139**
- 3. Applications thérapeutiques potentielles des composés et des extraits actifs ..... p.141**
- 4. Conclusion ..... p.142**

## **G BIBLIOGRAPHIE ..... p.144**

## **H MATÉRIEL ET MÉTHODES**

- 1. Matériel et méthodes appliqués à la phytochimie ..... p.153**
  - 1.1. Méthodes chromatographiques analytiques**
    - 1.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**
    - 1.1.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)**
  - 1.2. Méthodes chromatographiques préparatives**
    - 1.2.1. Chromatographie sur plaque préparative**

- 1.2.2. Chromatographie sur colonne ouverte
- 1.2.3. Chromatographie liquide moyenne pression
- 1.2.4. Chromatographie par élution sous basse pression
- 1.2.5. Chromatographie de partage centrifuge
- 1.2.6. Chromatographie circulaire centrifuge
- 1.2.7. CLHP semi-préparative

### **1.3. Méthodes analytiques**

- 1.3.1. Pouvoir rotatoire
- 1.3.2. Spectrophotométrie ultraviolet
- 1.3.3. Spectrophotométrie infra-rouge
- 1.3.4. Spectrométrie de masse
- 1.3.5. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
- 1.3.6. Pesées des échantillons

## **2. Matériel et méthodes appliqués à la biologie ..... p.158**

### **2.1. Tests réalisés sur *Plasmodium falciparum***

#### **2.1.1. Activité *in vitro***

2.1.1.1. La culture *in vitro*

2.1.1.2. La synchronisation

2.1.1.3. Evaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro*

#### **2.1.2. Tests *in vivo***

### **2.2. Tests *in vitro* réalisés sur *Leishmania amazonensis***

#### **2.2.1. Culture axénique de *Leishmania amazonensis***

#### **2.2.2. Evaluation de l'activité leishmanicide *in vitro***

### **2.3. Tests *in vitro* sur bactéries et sur champignon**

#### **2.3.1. Principes**

2.3.1.1. Mesure des CMI

2.3.1.2. Mesure de CMB ou des CMF

#### **2.3.2. Modes opératoires**

2.3.2.1. Méthode de mesure des CMI

2.3.2.2. Méthode de mesure des CMB ou CMF

**2.4. Mesure de la cytotoxicité**

**2.4.1. Principe**

**2.4.2. Mode opératoire**

**I PUBLICATIONS .....p.168**

# A INTRODUCTION

Depuis des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son mieux être. Avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tout type de remèdes naturels pour finalement élaborer ce que nous appelons aujourd'hui « la médecine traditionnelle ». L'étude de ces connaissances ancestrales par les sciences modernes révèle progressivement quelques secrets de la nature qui permettent à l'homme de poursuivre son évolution. C'est dans ce cadre que des disciplines hétérogènes telles que la botanique, la phytochimie, la biologie, l'anthropologie et bien d'autres sont mises en œuvre afin de décrire et d'interpréter les « pharmacopées traditionnelles ».

Les travaux ici présentés regroupent l'exercice de nombreuses disciplines et surtout de très nombreux collaborateurs auxquels je témoigne une profonde gratitude. Cette étude concerne les plantes issues de différentes médecines traditionnelles d'Amazonie et utilisées contre la première cause de mortalité dans le monde : le paludisme.

En premier lieu nous décrirons le paludisme suivant des axes historiques, biologiques et thérapeutiques en se rapprochant ponctuellement du cas de l'Amérique du Sud.

En second lieu, nous nous intéresserons à différentes études ethnopharmacologiques réalisées en Amazonie afin de sélectionner des plantes anti-parasitaires susceptibles d'être anti-paludiques. La première de ces études, réalisée en Guyane par des chercheurs de l'IRD (Institut de Recherche et Développement), a mené à la sélection de deux plantes qui seront étudiées dans une troisième et quatrième partie. La seconde enquête, réalisée au Pérou par notre équipe, a permis de révéler l'activité antiplasmodiale de huit autres plantes dont quatre d'intérêt thérapeutique.

Les troisième et quatrième parties de ce travail (D et E) seront consacrées à l'étude phytochimique bio-guidée de deux plantes (*Pseudoxandra cuspidata* Maas, et *Tapirira guyanensis* Aubl.) issues de la sélection ethnopharmacologique réalisée en Guyane et dont nous avons isolé les principaux composés responsables de l'activité antiplasmodiale de ces plantes et confirmant leur utilisation traditionnelle.

Enfin, nous étudierons le cas des plantes et des principes actifs les plus intéressants pour discuter leurs potentiels thérapeutiques et la validité de ce travail.

## B GÉNÉRALITÉS

La domestication de la nature a constitué pour l'être humain un atout majeur de son évolution. Néanmoins, il reste soumis à certaines contraintes d'ordre écologique évoluant avec lui, à l'exemple des maladies infectieuses.

Parmi celles-ci figure le paludisme, qui n'est pourtant la conséquence que d'un parasite unicellulaire primitif (un protozoaire), mais demeure la maladie la plus meurtrière dans le monde. En effet, ce fléau concerne 41 % de l'humanité soit 2,3 milliards de cas (comprenant primo-infections et récurrences). Avec une mortalité évaluée à environ 2,1 millions de décès par an, cette infection est d'autant plus néfaste qu'elle concerne, pour la moitié des cas, des enfants de moins de 5 ans (<http://www.who.int/topics/malaria/fr>). Cette maladie affecte tout particulièrement les pays en voie de développement. On observe une corrélation entre paludisme et sous-développement, nuisant au développement économique et social des pays concernés et freinant de ce fait la lutte efficace contre le parasite **[Brown, 1987]**.

L'agent du paludisme est un hématozoaire du genre *Plasmodium* transmis à l'homme par la piqure d'un moustique femelle du genre *Anopheles*.

Le traitement de cette infection a connu de grandes avancées au XIX<sup>ème</sup> siècle grâce à l'utilisation de la quinine (issue d'une Rubiaceae d'Amérique du Sud du genre *Cinchona*), pour combattre le parasite, et grâce au DDT (insecticide : dichlorodiphényltrichloroéthane) qui a, entre autres, localement supprimé les anophèles. En revanche, au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, le parasite et son hôte définitif ont développé les résistances nécessaires à leurs survies, provoquant la recrudescence de la maladie et suscitant le besoin de trouver de nouveaux principes médicamenteux.

Dès lors, les schémas thérapeutiques se sont succédés visant à détruire les souches résistantes sans occasionner d'effets secondaires majeurs, tout en demeurant économiquement accessibles **[Benoit-Vical, 2005]**.

Ces trois objectifs cités (efficacité, innocuité et accessibilité) n'ont pas encore été atteints. La phytothérapie est dans ce domaine une médecine à privilégier car elle pourrait garantir le libre accès au traitement. Pour ce qui est de l'innocuité et de l'efficacité des remèdes, les drogues végétales ont déjà prouvé leur intérêt, puisqu'elles sont à l'origine de la découverte de deux anti-paludiques majeurs : la quinine et l'artémisinine, ayant servi de base pour l'hémisynthèse de nombreux médicaments majeurs (chloroquine, méfloquine, primaquine, arthéméter...) **[Willcox, 2004 ; Gilani, 2005]**.

Par ailleurs, les zones impaludées sont souvent situées en régions tropicales et fournissent une très grande diversité d'espèces végétales. La sélection de ces espèces par enquête ethnopharmacologique est d'autant plus efficace que les populations concernées sont confrontées à cette maladie depuis de nombreux siècles, pendant lesquels ils ont pu accumuler une grande expérience de la pathologie et de ses remèdes [Phillipson, 1991 ; Shepard, 2004]. La démarche scientifique reliant l'étape de collecte des plantes à celle de leur étude chimique bioguidée requiert un grand nombre d'acteurs et nécessite une étroite collaboration entre divers univers culturels. Cette collaboration a pu être menée à bien grâce à la relation de confiance mutuelle établie avec nos partenaires européens, péruviens et plus largement Amérindiens.

## 1. Généralités sur l'histoire du paludisme

### 1.1. Historique du genre *Plasmodium*

Le paludisme est une maladie très répandue dans l'ensemble du règne animal (vertébrés, reptiles, insectes...) ce qui laisse présumer de l'ancienneté de son agent pathogène, le *Plasmodium*. De nombreuses espèces du genre sont décrites, mais toutes possèdent un ancêtre commun appartenant à la sous-classe des coccidies. La nature de l'hôte principal de ce parasite originel (un diptère ou un vertébré) est très controversée, néanmoins, il est prouvé que le paludisme humain est issu du paludisme simien (plus exactement d'une hépathocystose du *Cercopithèque*) [Garnham, 1966 ; Nozais, 1996].

L'origine géographique de son apparition chez le singe a fait l'objet de nombreuses hypothèses. En effet, si l'on considère la grande quantité de formes de *Plasmodium* chez les singes d'Asie par rapport à celles des singes d'Afrique, nous pourrions déduire que le parasite a eu plus de temps pour évoluer et se diversifier sur le premier continent (l'Asie) que sur le deuxième (cette remarque ne tenant pas compte des espèces transmises à l'homme telles que *P. falciparum* et *P. ovale*, moins anciennes, qui seraient originaires d'Afrique compte tenu de leur forte ressemblance avec *P. gonderi* du singe africain) [Wood, 1975 ; Escalante, 1998]. Cependant, les études génétiques phylogéniques, récentes et plus exactes, des différents *Plasmodium* tendent à infirmer cette hypothèse et à attribuer aux paludismes humains une origine africaine [Senior, 2001 ; Yotoko, 2006].

Néanmoins l'ensemble des hypothèses concernant le paludisme du singe permettent de dater l'origine de ce *Plasmodium* à environ -500 000 à -1 000 000 d'années, démontrant ainsi que ce parasite a toujours co-évolué avec l'être humain.

## **1.2. Historique du paludisme chez l'homme.**

### **1.2.1. Dans le monde**

Les premières traces de paludisme datent d'il y a 5000 ans, en Egypte, comme en témoigne la présence d'antigènes antipaludiques et de splénomégalies découverts sur des momies. Le papyrus d'Ebers (-1570) mentionne également la splénomégalie associée à des fièvres avec un traitement de la maladie. La présence de la maladie est mentionnée en Chine, 2 700 ans av. J.-C., époque à laquelle le médecin de l'empereur Huang Ti (appelé Nei Ching) décrit dans son ouvrage les symptômes de la fièvre tierce ou quarte (survenant tous les 3 ou 4 jours), associée à une splénomégalie. Ces fièvres sont symbolisées par l'apparition de trois démons : l'un portant un marteau (pour la céphalalgie), l'autre un seau d'eau (pour les frissons) et le dernier est muni d'un four (pour la fièvre), illustrant trois symptômes caractéristiques de l'accès palustre.

En Grèce, vers -2000 av. J.-C., Hippocrate établit également un descriptif fidèle des symptômes palustres, précisant que la fièvre quarte est la plus grave, mais il ne fait pas de rapprochement avec la présence de moustiques, et se réfère plutôt à un déséquilibre des humeurs du corps lié à l'eau stagnante environnante. En revanche, à la même époque en Inde, le chirurgien Susruta associe parfaitement ce type de fièvre à la présence de moustiques. La littérature grecque (avec les récits d'Homère, puis de Sophocle, d'Aristote et de Platon...) offre un témoignage de la persistance de la maladie au cours des siècles. Par la suite, l'empire romain sera également soumis à ce problème de santé publique, lui érigeant même une déesse (« Febris »). L'origine étymologique du mot paludisme vient du latin « *palus* » signifiant « marais », et le mot malaria est issu de l'italien : « *mal'aria* » désignant le mauvais air.

De siècle en siècle, cette maladie resta endémique dans le Sud de l'Europe, voire épidémique dans les régions du Nord, notamment en Angleterre, en Pologne et en Russie.

## 1.2.2. Concernant les Amériques

De nombreuses hypothèses ont été formulées concernant l'origine du paludisme en Amérique, mais la plus probable est celle de l'arrivée du parasite avec la colonisation.

En effet, ce continent ne recèle pas une grande variété d'espèces de *Plasmodium* (seuls les mammifères en sont atteints), ce qui suppose une implantation récente et non spontanée du parasite, suite à une invasion.

Trois grandes invasions ont ponctué l'histoire des Amériques [Hopkins, 1959] :

- La première eu lieu lors de la glaciation (il y a 15 000 à 40 000 ans), lorsque les premiers hommes passèrent par le détroit de Bering reliant la Russie à l'Alaska.
- La seconde invasion (encore incertaine) fut dirigée par les Vikings au X<sup>ème</sup> siècle.
- La troisième fut celle de la conquête espagnole et portugaise du XV<sup>ème</sup> siècle (en écartant l'hypothèse d'une découverte de ces territoires par les Chinois 50 ans plus tôt avec Zheng He, un eunuque, à qui l'empereur Zhu Di avait confié la flotte chinoise).

Concernant la première invasion (par le détroit de Bering), les conditions climatiques n'étaient pas favorables à la survie du parasite qui requiert une température supérieure à 15°C. De plus, les îles parsemant le chemin entre les deux Amériques sont exemptes d'anophèles. Concernant les invasions vikings, les conditions climatiques avant et pendant le voyage écartent aussi l'hypothèse de l'importation de la maladie à cette période. L'hypothèse la plus probable reste donc celle de l'importation du *Plasmodium* (et de nombreuses autres maladies infectieuses) par les conquistadors et leurs esclaves africains.

## 1.3. Histoire de la thérapeutique anti-paludique en Europe

Jusqu'au XVII<sup>ème</sup> siècle, aucun traitement anti-paludique efficace n'existait en Europe. En 1663, grâce aux observations du père Pedro de Calancha, la poudre de quinquina acquit la réputation d'un médicament efficace contre la malaria. Des missionnaires jésuites installés en Equateur avaient remarqué que les indigènes mâchaient l'écorce d'un arbre particulier lorsqu'ils éprouvaient des frissons. Plus tard, Linné donna à cet arbre le nom de *Cinchona*, inspiré de la comtesse Chinchon, épouse du vice-roi du Pérou dont on raconte qu'elle fut

guérie de ses accès fébriles grâce à cette plante. Ce sont les Jésuites, à l'initiative du Cardinal Juan de Lugo, qui populariseront cette poudre, dénommée « poudre des Jésuites », ou « poudre de la Comtesse », avec la guérison de grandes personnalités de l'époque, telles que Charles II en Angleterre ou le grand Dauphin (fils de Louis XIV) en France. Mais cette poudre de plante miraculeuse d'origine si lointaine est alors trop onéreuse pour la grande majorité des malades. C'est en 1820 que commence l'histoire de la quinine, principe actif anti-paludique isolé du Quinquina par Pelletier et Caventou. La structure définitive de ce composé ne sera établie qu'en 1908 et sa synthèse chimique sera réalisée pour la première fois en 1944 par Woodward et Doering. La seule manière de fournir de la quinine aux populations malades repose jusqu'à la 2<sup>nde</sup> guerre mondiale sur son extraction à partir de *Cinchona ledgeriana* et *Cinchona calisaya*, cultivés entre autres à Java par une société hollandaise.

A partir de la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, les avancées de la chimie de synthèse permettent la fabrication d'autres principes actifs anti-paludiques, tels que la pamaquine, la quimacrine, la chloroquine, l'amodiaquine, la primaquine, la pyriméthamine, qui sont pour beaucoup d'entre eux encore utilisés de nos jours.

Dans les années soixante, l'émergence de souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine a stimulé la recherche de nouvelles molécules actives telles que la méfloquine, l'halofantrine... C'est dans ce cadre que le « qing-hao » (*Artemisia annua* L.) a été étudié, avec l'isolement de l'artémisinine en 1972 (à Shanghaï), qui est actuellement l'une des molécules anti-paludiques les plus efficaces. Les premiers témoignages de l'utilisation de cette plante remontent à plus de 2000 ans, comme le prouve la découverte d'une « prescription » la mentionnant dans une tombe de la dynastie Han datée à -168 av. J.-C. **[Sherman, 1998].**

Suite à la valorisation de ce principe actif, des dérivés de l'artémisinine comme l'artéméther ou l'artésunate de sodium ont été synthétisés afin d'améliorer l'activité de ce principe actif.

La découverte de grands médicaments tels que certains antipaludiques montre l'incidence que peuvent avoir les médecines traditionnelles et l'ethnopharmacologie sur le développement des techniques thérapeutiques modernes, notamment dans les domaines de la phytothérapie et de la chimie des produits naturels.

## 2. Généralités sur la biologie du *Plasmodium*

### 2.1. Cycle et biologie du *Plasmodium*

En 1880, un médecin militaire français (A. Laveran) identifie et caractérise pour la première fois le *Plasmodium* humain (*P. falciparum*). Ces travaux seront poursuivis plus tard par bien d'autres scientifiques dont R. Ross qui établit en 1897 le cycle biologique complet du parasite.

#### 2.1.1. Classification

<b>Règne :</b>	Protozoaire (protiste)
<b>Embranchement :</b>	Apicomplexa
<b>Classe :</b>	Sporozoaire (Haemosporidea)
<b>Sous-classe :</b>	Coccidiasina
<b>Ordre :</b>	Eucoccidies (Haemosporida)
<b>Sous-ordre :</b>	Haemosporina
<b>Famille :</b>	Plasmodidae
<b>Genre :</b>	<i>Plasmodium</i>

Il existe chez l'homme quatre espèces de *Plasmodium* (*P. ovale* Stephens, *P. vivax* Feletti et Graci, *P. malariae* Feletti et Graci et *P. falciparum* Welch) de répartitions géographiques variées, et provoquant des paludismes de symptomatologies diverses.

#### 2.1.2. Cycle biologique

Malgré leur nombre (un peu plus d'une centaine), toutes les espèces de *Plasmodium* possèdent des cycles biologiques très similaires et nécessitent deux hôtes :

- Un moustique femelle du genre *Anopheles*, hôte définitif, chez lequel s'effectue le cycle sexué.
- Un hôte intermédiaire (un vertébré) chez lequel se déroule le cycle asexué haploïde du parasite.

### 2.1.2.1 Cycle sexué chez l'anophèle femelle

Tout d'abord, le moustique se contamine en prenant un repas sanguin chez un individu porteur du parasite, ingérant ainsi quelques gamétocytes.

Puis, le *Plasmodium* subit une première maturation au sein du moustique. Les gamétocytes se différencient en gamètes, qui, après fécondation, engendreront un œuf mobile (ookinète) traversant la paroi gastrique. Une fois dans la cavité cœlomique, l'oocyste (œuf immobile) va donner naissance à plusieurs sporozoïtes migrant jusqu'aux glandes salivaires du moustique d'où ils seront éjectés lors du prochain repas sanguin de l'hôte. La durée de cette maturation est étroitement liée à la température extérieure. Par exemple, pour *P. falciparum*, il n'y a pas de maturation en dessous de 18° C ou au-dessus de 35°, mais elle est optimale vers 24° C. Il existe donc peu de risques de contamination en altitude.

### 2.1.2.2. Cycle asexué chez l'homme

Ce cycle est divisé en deux parties, l'une exoérythrocytaire, l'autre endoérythrocytaire.

#### Cycle exoérythrocytaire

Après inoculation dans l'homme par l'anophèle femelle, lors d'un repas sanguin, les sporozoïtes migrent jusqu'au foie pour devenir des trophozoïtes hépatocytaires. Ces trophozoïtes vont grossir et accroître leur nombre de noyaux (jusqu'à 10 000 ou 30 000) formant ainsi des corps bleus ou schizontes, provoquant l'éclatement de l'hépatocyte avec libération dans le sang des mérozoïtes issus de chaque noyau. Selon les espèces, une partie de la souche peut rester dans le foie. Il peut donc y avoir, pour les espèces mineures, plusieurs accès dits de reviviscence à partir de la souche initiale hépatique (ce qui n'est pas le cas avec *Plasmodium falciparum*). Pour *P. vivax* ou *P. ovale* certains sporozoïtes restent à l'état quiescent dans les hépatocytes, sous forme d'hypnozoïte. Le foie sert alors d'organe réservoir pendant plusieurs années (Figure 1).

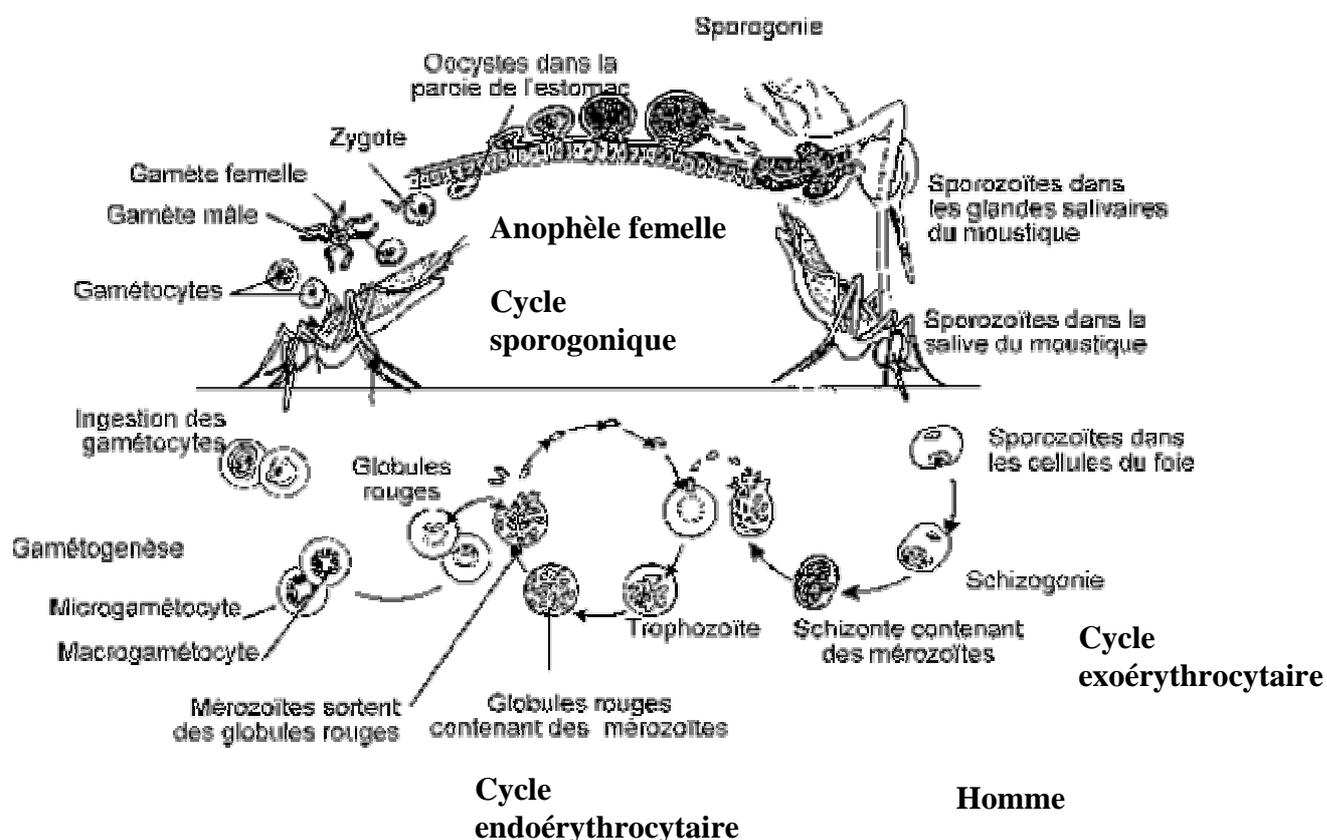
#### Cycle endoérythrocytaire

Après reconnaissance de certains récepteurs membranaires des hématies, le mérozoïte pénètre à l'intérieur du globule rouge pour s'y nourrir des acides aminés de l'hémoglobine (l'hème restante sera polymérisée en hémozoïne). Le parasite augmente alors de taille et se multiplie jusqu'à former un schizonte mûr qui provoque l'éclatement de la cellule sanguine et la libération des mérozoïtes avec l'hémozoïne (entraînant une poussée de fièvre avec des accès pernicieux dus à des micro-thromboses cérébrales dans les cas d'une infection à *P. falciparum*).

La durée totale du cycle endoérythrocytaire est de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* provoquant des fièvres tierces ; ce cycle dure 72 heures pour *P. malariae* (fièvre quarte).

Il n'y a pas de rechutes liées aux formes exoérythrocytaires concernant *P. falciparum* et *P. malariae* mais seulement des reviviscences endoérythrocytaires.

Les tests *in vitro* que nous avons réalisés lors de ce travail portent sur la partie endoérythrocytaire du cycle.



**Figure 1 : Cycle biologique de *P. falciparum***

(<http://www.simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/labo/Protocoles/protozoa.htm>)

## 2.2. Description de la maladie

### 2.2.1. Accès de primo-invasion

- Phase d'incubation : « silencieuse », elle correspond à la schizogonie hépatique et dure 12 à 20 jours et parfois plus.

- Phase d'invasion : la fièvre est continue associée à un malaise général, des courbatures, des céphalées, des nausées ou des vomissements et parfois des diarrhées. La splénomégalie est absente au début et peut apparaître au cours d'une évolution sans traitement.

- L'évolution : avec un traitement approprié, on observe une disparition des symptômes en quelques jours. En l'absence de traitement, la symptomatologie disparaît après plusieurs accès fébriles, mais des rechutes par reviviscence schizogonique apparaîtront par la suite.

### **2.2.2. Fièvre tierce bénigne**

Elle correspond aux accès par reviviscence schizogonique.

L'accès est stéréotypé, précédé par des prodromes (céphalées, nausées, herpès labial), puis débute brutalement avec :

- frissons
- fièvre
- sueurs et défervescences thermiques.

La rate est souvent hypertrophiée pendant l'accès. Le malade peut avoir plusieurs accès durant la journée. Puis les symptômes disparaissent pour réapparaître 48 h plus tard. Ceci correspond au rythme tierce des accès. Sous traitement, l'évolution est rapidement favorable. Sans traitement, la guérison survient spontanément après une douzaine d'accès, mais des rechutes peuvent survenir dans les 3 ans selon une fréquence variable en rapport avec les isolats de *Plasmodium* au niveau hépatique (20 jours à plusieurs mois).

### **2.2.3. Formes cliniques**

Les formes frustes ou asymptomatiques sont fréquentes en zone d'endémie.

Les fièvres rémittentes sont rares et correspondent d'avantage à une infestation massive.

#### **2.2.3.1. Paludismes à *Plasmodium ovale* et *vivax***

Globalement la symptomatologie est semblable dans les deux cas, comme décrit précédemment. L'espèce *P. vivax* (avec *P. falciparum*) est la plus fréquente en Amérique du Sud, *P. ovale* étant surtout présente en Afrique.

#### **2.2.3.2. Paludisme à *Plasmodium malariae***

Ce paludisme comporte quelques différences avec les 2 espèces précédentes.

- L'incubation est plus longue (autour de 3 semaines et plus).
- Les accès fébriles en phase d'état ont un cycle quartane (l'accès survient un jour sur trois).
- Des complications à type de néphrites quartanes sont décrites mais rares.

### **2.2.3.3. Paludisme à *Plasmodium falciparum***

#### Accès simples à *P. falciparum*

Ce sont des accès palustres classiques sans aucun signe de malignité, alors qu'il s'agit du paludisme le plus mortel. Ils se caractérisent par plusieurs phases :

- phase d'incubation : asymptomatique durant 7 à 10 jours
- phase d'invasion : caractérisée par une fièvre continue (39°-40°) accompagnée de céphalées, nausées ou vomissements
- phase d'état : les accès prennent une évolution de type tierce (toutes les 48 h) et sont caractérisés par de la fièvre 39°-40°, des frissons, des sueurs accompagnées de céphalées, de vomissements et d'une splénomégalie avec parfois une hépatomégalie
- évolution : en dehors du traitement, un accès pernicieux peut survenir à tout moment de révolution d'un accès simple. Avec un traitement efficace, l'évolution est favorable en quelques jours.

#### Accès pernicieux ou neuropaludisme

C'est la complication la plus redoutable au décours d'un paludisme à *P. falciparum* car elle est souvent mortelle.

Le début est brutal, foudroyant, le malade tombe dans le coma avec une insuffisance rénale aiguë, un oedème pulmonaire, une encéphalite et parfois une coagulation intravasculaire disséminée.

Le diagnostic et le traitement doivent être établis d'urgence, en même temps que des soins de réanimation. En l'occurrence d'un tel traitement, la guérison se fera sans séquelles neurologiques. Toutefois le taux de létalité reste élevé dans le cas d'un diagnostic tardif.

### **2.2.3.4. Complications générales aux quatre espèces : la fièvre bilieuse hémoglobinurique**

Elle survient après un traitement par la quinine ou suite à un brusque changement de température au cours d'une prophylaxie par la quinine (retour en métropole des anciens coloniaux). C'est une tubulo-néphrite aiguë fébrile (accident immuno-allergique à la quinine) qui se caractérise par de la fièvre (40°C), des lombalgies, de la pâleur, un ictère, des urines rouges ou brunes par hémoglobinurie; la mort survient en quelques jours dans 30 % des cas.

### 2.2.3.5. Cas particuliers

#### Le paludisme post transfusionnel

Le diagnostic doit être envisagé quand il existe une symptomatologie évoquant le paludisme après une transfusion de sang. Il est caractérisé par une incubation très courte et l'absence de reviviscence schizogonique pour toutes les espèces.

#### Associations

Association possible de 2 espèces de *Plasmodium* : symptomatologie atypique.

Associations possibles : paludisme + virose (hépatite) ou bactériose (salmonellose) ou autre parasitose (amibiase...).

#### Paludisme de l'enfant

Les nouveaux-nés sont protégés pendant les 3 premiers mois de la vie par les anticorps maternels, puis l'enfant traverse une période critique entre 4 mois et 4 ans. La symptomatologie peut être trompeuse en particulier pour *P. falciparum*, avec parfois un aspect de choléra, anémie, convulsions qui perturbent le diagnostic.

#### Le paludisme de la femme enceinte

Il est plus grave pour les femmes primipares, mais le risque de contamination de l'enfant est peu élevé.

#### Autres cas particuliers

Paludisme de l'immunodéprimé (accès palustres caractéristiques parfois graves, mais sans rechutes après traitement), paludisme des aéroports (le diagnostic est souvent tardif, la mortalité est de ce fait, de l'ordre de 10 %)...

### 2.2.4. Protections individuelles contre les formes graves de paludisme

La résistance de certains individus aux formes graves de paludisme peut être expliquée par des particularités génétiques telles que la drépanocytose (hémoglobine S), la thalassémie ( $\alpha^+$ ), l'ovalocytose mélanésienne, la déficience en G6PD (enzyme impliquée dans la voie des pentoses et générant du NADPH, co-enzyme conférant au glutathion son rôle anti-oxydant, mais cette déficience entraîne également de fortes hémolyses lors de traitements à la primaquine et autres anti-paludiques), les groupes sanguins Duffy (-) (contre *P. vivax*) ou certains groupes HLA (HLA-B-53...). Souvent, l'épidémiologie de ces maladies ou

particularités génétiques montre une plus grande incidence dans les zones de paludisme endémique [Inhorn, 1997 ; Abel, 1999].

D'autres particularités, telles que des régimes exclusivement lactés (déficients en acide para-aminobenzoïque) ou hypo-protéinés, ou la présence de certains pathogènes (tels que des bactéries comme *Klebsiella pneumoniae* chez le singe) [Gysin, 1993 ; Mohandass, 2005] sont autant de circonstances allant contre le développement du parasite, bien qu'elles ne facilitent pas la vie du malade.

## 2.3. Traitements curatifs du paludisme

Les dérivés de la quinine, autrefois largement utilisés, ont vu leur efficacité très diminuée en raison de l'émergence de résistances. Actuellement, ces principes actifs ne sont utilisés que pour de rares paludismes à *P. falciparum* chloroquinosensibles ou contre les 3 autres espèces *P. ovale*, *P. malariae*, *P. vivax*. Dans le cas du *P. falciparum* chloroquino-résistant, de nouvelles combinaisons médicamenteuses telles que les ACT (Artemisinin-based combination therapy) sont utilisées.

### 2.3.1. Les cibles plasmodiales des médicaments

Face à la résistance plasmodiale, la compréhension des modes d'action cellulaire des médicaments antipaludiques est essentielle afin d'optimiser leur emploi et de comprendre les mécanismes impliqués dans cette résistance. Le *Plasmodium* dispose pour son développement intra-érythrocytaire d'un métabolisme et de moyens de défense spécifiques qui constituent autant de cibles aux anti-paludiques. On distingue :

- la vacuole nutritive du parasite qui constitue le siège de la digestion de l'hémoglobine, de la cristallisation de l'hème et des moyens de défense contre le stress oxydant ;
- le cytoplasme comportant le cytosol et deux organites essentiels : les mitochondries et l'apicoplaste ; ils sont nécessaires à la biosynthèse des acides nucléiques ;
- la membrane plasmique (constituée de phospholipides, de canaux calciques et parasitophores) qui est le siège du transport nutritionnel.

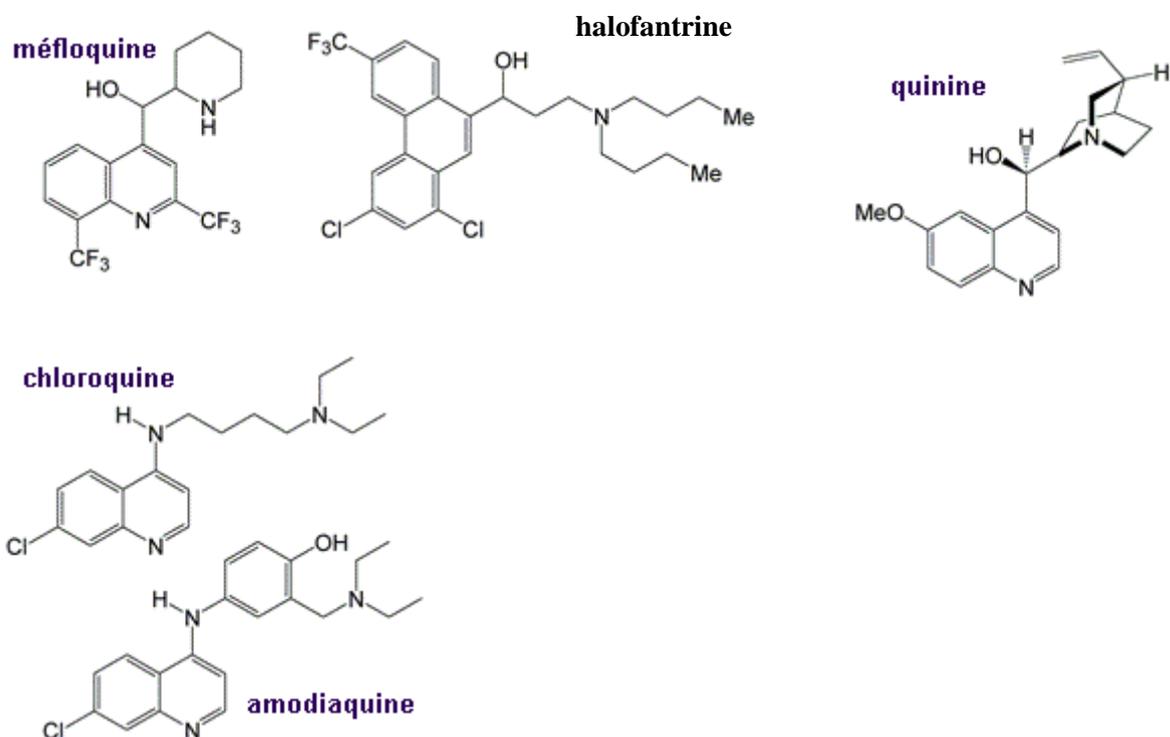
## 2.3.2. Modes d'action des principaux anti-paludiques actuels

Les principaux anti-paludiques actuels peuvent être classés selon leur mode d'action en deux catégories.

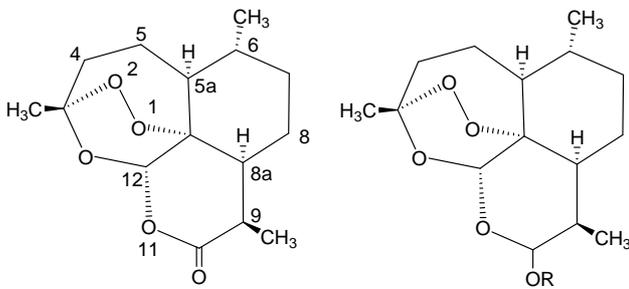
### 2.3.2.1. Les schizonticides électifs (sanguins et tissulaires)

Ce groupe comprend les dérivés quinoléiques et les dérivés de l'artémisinine.

Les dérivés quinoléiques : ce sont les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine), amino-8-quinoléines (primaquine) et les amino-alcools (quinine, méfloquine, halofantrine, luméfantrine). Ces molécules interfèrent avec le métabolisme de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive en inhibant la formation de l'hémozoïne.



Les dérivés de l'artémisinine (artésunate, artéméther) : cette nouvelle classe d'antipaludiques de type peroxyde interfère également avec le métabolisme de l'hémoglobine, par libération de radicaux libres, toxiques pour le parasite. Les dérivés de l'artémisinine ont également une action gamétocytocide, qui réduit la transmission et limite les risques de voir émerger des résistances.



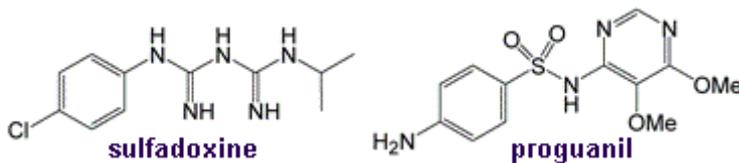
**R : H** : dihydroartémisinine  
**R : Me** : artemether  
**R : Et** : arteether  
**R : OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COONa** : artesunate  
**R : OCH<sub>2</sub>(p-C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)COOH** : acide artelinique

**artémisinine**

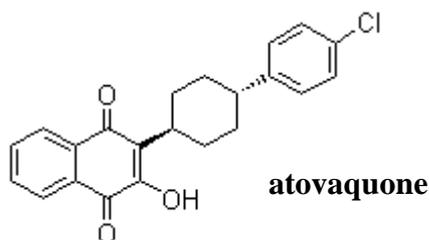
### 2.3.2.2. Les inhibiteurs des acides nucléiques

Ce sont des antimétabolites qui bloquent la division du noyau de l'hématozoaire. Ce groupe comprend les antifolates, les naphtoquinones et les antibiotiques.

Les anti-folates : ils sont répartis en deux familles, les antifoliques (sulfamides, dont la sulfadoxine ; sulfones), et les antifoliniques (proguanil, pyriméthamine). Ils agissent au niveau de la voie de synthèse des folates, qui sont essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques. Les antifoliques inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS) produisant l'acide folique. Les antifoliniques inhibent la dihydrofolate réductase (DHFR) produisant l'acide folinique.

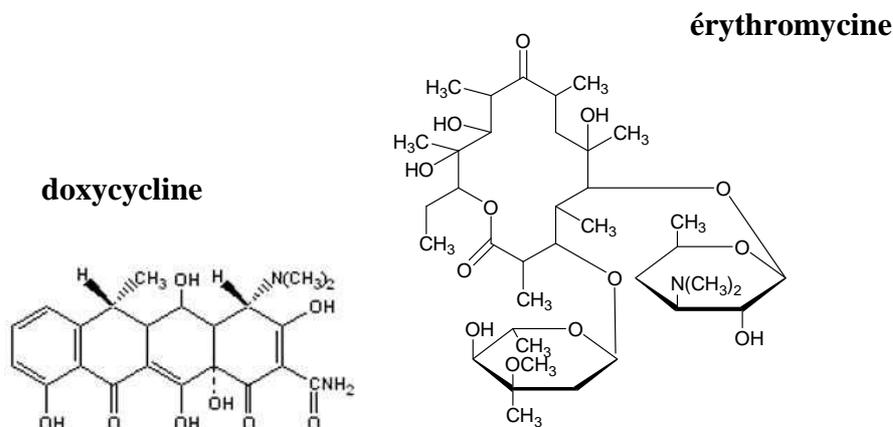


Les naphtoquinones : l'atovaquone est un inhibiteur puissant des fonctions mitochondriales bloquant la chaîne de transfert d'électrons au niveau de son enzyme-clef, la dihydroorotate deshydrogénase (DHOdase). Elle a peu d'impact thérapeutique lorsqu'elle est utilisée seule. En combinaison avec un anti-métabolite (proguanil), on observe une intéressante synergie d'action grâce à une inhibition séquentielle de la synthèse des pyrimidines. Une originalité de l'association atovaquone-proguanil réside dans son action sur le stade hépatocytaire de *P. falciparum*.



**atovaquone**

Les antibiotiques : les tétracyclines (doxycycline), les macrolides (érythromycine, azythromycine, clindamycine) peuvent inhiber la synthèse protéique par inhibition de certaines fonctions de l'apicoplaste.



### 2.3.2.3. Les associations d'anti-paludiques

Les nouveaux anti-paludiques ayant fait l'objet de développements récents sont tous associés, en bithérapie au moins, et se démarquent d'anciennes associations telles que : la sulfadoxine-pyriméthamine (Fansidar®) capable de sélectionner rapidement des mutants résistants. Certaines sont fixes : l'atovaquone-proguanil (Malarone®), l'arthéméter-luméfantrine (Coartem®, Riamet®), chlorproguanil-dapsone (Lapdap™). D'autres sont libres, associant toujours un dérivé de l'artémisinine. Leur rapidité d'action permet la réduction du risque de transmission et l'absence de chimiorésistance de *P. falciparum* (artésunate-méfloquine, artésunate-amodiaquine, artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine).

En prophylaxie, les associations chloroquine-proguanil (Savarine®) et atovaquone-proguanil (Malarone®) sont recommandées dans les zones de chloroquino-résistance.

([http : //www.medecinetropicale.free.fr/spe/paluaubry.htm.](http://www.medecinetropicale.free.fr/spe/paluaubry.htm))

# C SÉLECTION DE PLANTES D'AMAZONIE TESTÉES SUR *P.* *FALCIPARUM*

Les plantes tropicales étudiées ont principalement deux origines.

Le premier groupe d'espèces, originaire de Guyane française, est issu de plusieurs enquêtes ethnopharmacologiques effectuées précédemment par d'autres équipes de travail. Deux de ces plantes, les plus actives *in vitro* sur *P. falciparum*, ont alors fait l'objet d'une étude chimique (isolement des principes actifs par bioguidage détaillé dans les parties D et E).

Le second groupe concerne des espèces originaires du Pérou et correspond à des plantes utilisées en médecine traditionnelle par les Quechua des basses terres amazoniennes pour soigner les crises de paludisme (en particulier la fièvre et d'autres symptômes de cette maladie). L'enquête ethnopharmacologique réalisée par nos soins réunit d'une part un corpus de données concernant la conception de la maladie par ces groupes ethniques, et d'autre part, met en évidence l'activité antiplasmodiale de certaines plantes jusqu'à présent peu étudiées.

Les tests *in vitro* réalisés sur *P. falciparum* sont basés sur deux techniques de détections. La première, appelée « test LDH » du nom de l'enzyme lactate déshydrogénase, ou également appelée « XTT » (sel de tétrazolium) repose sur une détection spectrophotométrique (absorption à 450 nm) décrite dans la partie « Matériel et méthodes ». La seconde méthode employée est plus sensible et basée sur le radio-marquage à l'hypoxanthine tritiée (également décrite dans la partie « Matériel et méthodes »).

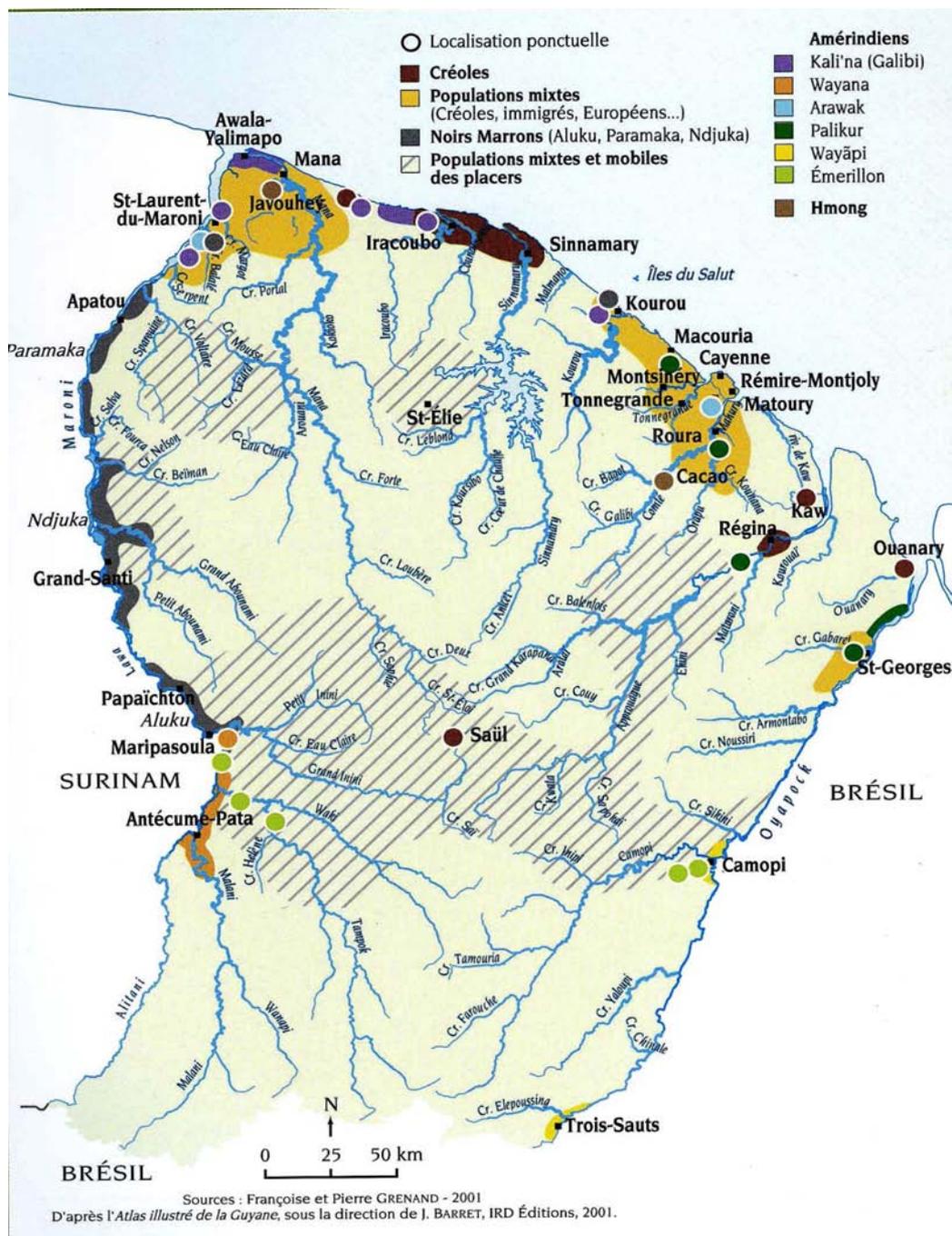
## 1. Plantes issues de la médecine traditionnelle guyanaise

### 1.1. Généralités sur la Guyane française

La Guyane française est un département couvrant une surface de 91 000 km<sup>2</sup>, peuplé d'environ 202 000 habitants (<http://www.insee.fr/fr/recensement.htm>).

Parmi cette population, les Amérindiens constituent le substrat le plus ancien. Ils sont subdivisés en trois familles linguistiques que sont les Tupi-guarani (Wayãpi et Emerillon), les Arawak (Palikur et Arawak-Lokono) et les Karib (avec les Kali'na ou Galibi et les Wayana).

Le groupe culturel majoritaire est constitué de Créoles, partageant leur territoire avec d'autres groupes tels que les émigrés haïtiens et brésiliens, les Français métropolitains, les Noirs Marrons et d'autres minorités (Hmongs, Chinois...) (Figure 3).



**Figure 3 : Carte de répartition des populations de Guyane française [Grenand, 1987 ]**

La forêt équatoriale domine largement ce territoire délimité par l’océan et par deux fleuves : le Maroni et l’Oyapock.

Son climat principalement tropical favorise la persistance du paludisme malgré les efforts gouvernementaux déployés pour éradiquer la maladie. Trois espèces de *Plasmodium* sont présentes sur le territoire et offrent une répartition géographique originale : la majorité

des paludismes à *P. falciparum* et *P. malariae* sont situés le long du fleuve Maroni, alors que *P. vivax* se trouve essentiellement distribué sur les berges de l'Oyapock [Grenand, 1987 ; Hurault, 1998].

## 1.2. Sélection des plantes

Diverses études ethnopharmacologiques menées par l'IRD ont permis de sélectionner 19 espèces végétales ayant un lien avec le traitement du paludisme ou des maladies parasitaires. Certaines de ces plantes sont également issues d'une recherche bioguidée systématique effectuée sur la famille des Fabaceae, beaucoup de ces espèces étant employées dans l'industrie du bois [Cirad-forêt, 1993]. Les plantes ont été traitées par différents solvants, tels que le dichlorométhane, puis le méthanol (ou acétone/eau, 7/3, pour les Fabaceae), ou par infusion dans l'eau. Les extraits obtenus ont été testés sur *P. falciparum*, en utilisant une détection colorimétrique (LDH : enzyme lactate déshydrogénase, décrite dans la partie « matériel et méthodes ») (Tableau 1).

*Alexa wachenheimi* Benoist (Fabaceae) (580 ind.)

Les Wayãpi utilisent l'écorce de cet arbre en lavage externe contre la fièvre. Une espèce voisine, *A. imperatricis* (R.H. Schomb.) Baill. est également employée par les amérindiens (du Nord-Ouest) contre le paludisme et les morsures de *Bothrops* (serpent venimeux). [Grenand, 1987].

*Andira coriacea* Pulle (GB2844)

et *Andira excelsa* H. B. K. (*Vouacapoua americana* H.B.K.) (Fabaceae) (GB2849)

Les copeaux de bois d'*Andira coriacea* peuvent provoquer une diminution de la parasitémie lorsqu'ils servent de litière chez les singes impaludés [Sauvain, 1989]. La sève d'une autre espèce du même genre (*A. surinamensis* (Bondt) Splitg. ex Amshoff.) est également utilisée en Guyane pour guérir les lésions buccales [Kraft, 2001], (<http://www.igitur-archive.library.uu.nl>) [Cirad-forêt, 1993].

*Chimarrhis turbinata* DC. ; (*Pseudochimaris turbinata* Ducke) (Rubiaceae) (GB3026)

La décoction des feuilles est utilisée en Guyane française pour soigner le paludisme [Bertani, 2005].

***Dicorynia guianensis*** Amshoff (Fabaceae) (GB2840)

Un usage des copeaux de bois comme piscicide est connu des populations créoles. Ce processus de pêche par empoisonnement exige un traitement rapide des poissons (vidage et écaillage), car cette plante présente également des effets toxiques pour l'organisme humain. (<http://www.igitur-archive.library.uu.nl.>) [**Cirad-forêt, 1993**].

***Diplotropis purpurea*** Rich. (Fabaceae) (GB2838)

Cet arbre, dont la solidité a fait sa réputation (dénommé « Tatabu » en Arawak « Tata » signifiant dur), est fréquemment utilisé dans la construction des canoës, et possède par ailleurs des propriétés anti-fongiques [**Cirad-forêt, 1993 ; Miller, 2003**].

***Eperua*** sp. (Fabaceae) (GB2845)

Les copeaux de ce genre de bois, utilisés comme litière, auraient un effet bénéfique contre le paludisme chez les singes écureuils en captivité (*Saimiri sciureus*) [**Sauvain, 1989**].

L'espèce *E. falcata* Aubl. est utilisée par les Alukus et les Créoles comme analgésique dentaire (décoction de l'écorce), et la résine est employée par les Saramaka pour ses vertus cicatrisantes (l'effet antiseptique a été démontré *in vitro*) [**Delaveau, 1988**].

***Hymenea courbaril*** L. (Fabaceae) (GB3036)

En médecine traditionnelle créole, la décoction de l'écorce de tronc de cet arbre très commun possède une fonction dépurative et antipyrétique. Additionnée de sucre, elle peut remplacer le thé. On utilise également la résine pour traiter les plaies récentes. Chez les Wayãpi, les sécrétions résineuses fraîches ainsi que l'arille des fruits offre un remède contre la dysenterie. Les Palikur, quant à eux, se servent de la résine fraîche délayée dans de l'eau pour combattre les « vents » (douleurs abdominales) et les « maux de cœur ». L'écorce est préparée en décoction (avec du miel) contre les maux d'estomac [**Grenand, 1987**].

Le thé de courbaril est également utilisé contre la grippe, les courbatures et le paludisme, et l'arille est comestible [**Cirad-forêt, 1993 ; Andel, 2000 ; Bertani, 2005**].

***Hymenolobium flavum*** Kleinh (Fabaceae) (GB2848)

L'écorce de ce grand arbre est préparée en décoction à titre d'antiseptique local, (<http://www.igitur-archive.library.uu.nl.>). Une diminution de la parasitémie chez les singes atteints de paludisme est également observée lors d'un usage de ce bois en litière [**Sauvain, 1989 ; Cirad-forêt, 1993**].

***Inga alba*** Willd. (Fabaceae) (231 ind.)

Cette espèce, comme de nombreuses autres espèces du même genre, produit une sève riche en tanin utilisée comme colorant, ainsi que des fruits comestibles. Les Wayãpi utilisent l'écorce râpée et pressée en usage externe contre les dermatoses buccales et les piqûres de fourmi chez l'enfant. De manière générale, on observe un usage fréquent de l'écorce contre les infections cutanées et pour ses vertus cicatrisantes [Grenand, 1987 ; Andel, 2000].

***Parkia nitida*** Milk. (Fabaceae) (638 ind.)

Les Tiriyo (de la famille linguistique Karib) du Surinam utilisent le bois de cet arbre en décoction (une fois râpé), mais aussi en lavage externe pour soigner les fièvres. Les Wayãpi de Guyane, pour leur part, ne se servent que de la partie noire du fruit qu'ils consomment pour son goût sucré [Cirad-forêt, 1993] (<http://www.MedPlantsGui3.>).

***Paramachaerium ormosioides*** Ducke, (*Pterocarpus ormosioides* Ducke) (539 ind.) ;

et ***Pterocarpus rohrii*** Vahl. (Fabaceae) (GB3017)

*P. rohrii* est une espèce utilisée en Guyane contre le paludisme. *In vivo*, seule la décoction des feuilles présente une activité sur la souris (infectée par *P. yhoeli*) mais aucune activité n'a été enregistrée contre *P. falciparum* (*in vitro*) [Bertani, 2005].

***Peltogyne*** sp. (Fabaceae) (GB2843)

Ce genre se compose d'espèces employées comme bois de construction (*P. venosa* (Vahl.) Benth.). Placés en litière, les copeaux auraient un effet positif contre le paludisme observé chez des spécimens de singes écureuils en captivité [Sauvain, 1989 ; Cirad-forêt, 1993].

***Pseudoxandra cuspidata*** Maas. (Fabaceae) (GB2983)

Les indiens Wayãpi et Palikur utilisent le décocté d'écorce contre le paludisme [Bertani, 2005].

***Psidium persoonii*** Mc Vaugh. (Myrtaceae) (MF2057)

La décoction de l'écorce (avec ou sans les feuilles) est administrée par voie orale pour ses vertus anti-diarrhéique et anti-paludique [Grenand, 1987 ; Bertani, 2005].

***Tapirira guianensis*** Aubl. (Anacardiaceae) (GB3068)

La décoction de l'écorce est utilisée comme anti-diarrhéique et anti-vomitif. En usage externe, les bienfaits de cette décoction sont connus par les Amérindiens contre le muguet (en bain de bouche) et les infections de la peau, facilitant également la cicatrisation. Les usages

thérapeutiques traditionnels de cette espèce présentent de nombreuses similitudes avec celles d'*Anacardium occidentale* L. (cajou), dont on connaît aussi un usage contre la leishmaniose [Grenand, 1987].

En Bolivie, chez les indiens Tacana, l'écorce de *T. guyanensis* est utilisée contre le paludisme [Deharo, 2001].

*Wisteria floribunda* Willd. (Fabaceae)

Cette plante ornementale d'origine asiatique (la glycine) n'a pas fait l'objet d'une sélection par enquête ethnopharmacologique, mais a été sélectionnée suivant l'hypothèse phytochimique de la présence d'isoflavones anti-paludiques [Konoshima, 1988].

*Zygia racemosa* Ducke (Fabaceae) (GB2847)

Les espèces appartenant à ce genre sont utilisées par un grand nombre de populations indiennes d'Amérique du Sud (ex. : *Z. latifolia* Fawc et Rendle). La décoction de l'écorce, en lavage externe, permet de lutter contre les douleurs corporelles et les fièvres.

### 1.3. Activité antiplasmodiale des plantes sélectionnées (test LDH)

Tableau 1 : Activité antiplasmodiale des extraits de plante testés

Drogues	Familles	Rapport (%) : Extrait / Plante sèche			Activité antiplasmodiale  CI <sub>50</sub> (LDH) <i>P. falciparum</i> (FcB1) (µg/ml)
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Acetone / eau (7/3) ou MeOH	H <sub>2</sub> O	
<i>Alexa wachenheimi</i> Benoist ; ET	Papilionaceae	0,8	8,7	0,2	∅
<i>Andira coriacea</i> Pulle ; CB	Papilionaceae	0,7	1,8	10,2	<b>38,3 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)</b>
<i>Andira excelsa</i> H. B. K. ; CB	Papilionaceae	3,1	7,1	0,8	∅
<i>Chimarrhis turbinata</i> DC. ; ET	Rubiaceae	1,7	13,0	0,6	∅
<i>Dicorynia guianensis</i> Amshoff. ; CB	Caesalpinaceae	0,1	2,5	4,6	∅
<i>Diplostropis purpurea</i> Rich. ; CB	Papilionaceae	0,2	5,2	7,3	∅
<i>Eperua</i> sp. ; CB	Caesalpinaceae	2,4	14,4	3,4	∅
<i>Hymenea courbaril</i> L. ; CB	Caesalpinaceae	0,3	7,2	2,7	∅
<i>Hymenolobium flavum</i> Kleinh. ; CB	Papilionaceae	0,2	6,1	2,1	∅
<i>Inga alba</i> Willd. ; ET	Mimosaceae	0,4	20,5	0,5	∅
<i>Parkia nitida</i> Mik. ; ET	Mimosaceae	0,9	7,8	0,5	∅
<i>Paramachaerium ormosioides</i> Ducke ; ET	Papilionaceae	0,4	14,2	1,0	∅
<i>Peltogyne</i> sp. ; CB	Caesalpinaceae	0,1	8,1	1,0	∅
<i>Pseudoxandra cuspidata</i> Maas. ; ET	Annonaceae	1,3	6,0	7,2	<b>10,0 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ; 22,5 (MeOH) ; 36,2 (H<sub>2</sub>O)</b>
<i>Psidium persoonii</i> Mc Vaugh. ; F + T	Myrtaceae	0,6	14,3	12,3	∅
<i>Pterocarpus rohrii</i> Vahl. ; E + T	Papilionaceae	1,9	23,7	0,9	∅
<i>Pterocarpus rohrii</i> ; F		4,3	4,2	0,9	∅
<i>Tapirira guianensis</i> Aubl. ; ET	Anacardiaceae	3,2	7,3	1,5	<b>19,2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)</b>
<i>Wisteria floribunda</i> Willd. ; F	Papilionaceae	3,3	12,3	0,3	∅
<i>Wisteria floribunda</i> ; E + T		0,9	4,9	0,3	∅
<i>Zygia racemosa</i> Ducke ; CB	Mimosaceae	0,4	1,8	0,7	<b>35,2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)</b>

CB : Cœur de Bois ET : Ecorce de Tige F : Feuilles T : Tiges

Les espèces appartenant à la famille des Fabaceae ont été traitées par le dichlorométhane puis par un mélange acétone/eau (7/3, V/V) afin d'optimiser les rendements, tandis que les autres espèces ont été traitées par du méthanol. Ces extraits successifs ont été effectués sous pression (100 bar) à 50°C par 2 x 10 ml de chaque solvant. L'extraction par l'eau a été réalisée par infusion de la drogue sèche.

Parmi les plantes testées, quatre extraits (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ont été retenus :

- *Andira coriacea* : possédant une faible activité (CI<sub>50</sub> = 38,3 µg/ml) et déjà étudiée pour ses iso-flavones antiplasmodiales [Sauvain, 1989].
- *Zygia racemosa* : espèce peu étudiée mais d'activité faible (CI<sub>50</sub> = 35,2 µg/ml).

- *Tapirira guianensis* : activité modérée (CI<sub>50</sub> = 19,2 µg/ml) mais ne comportant que peu de données bibliographiques concernant les composés qu'elle renferme.
- *Pseudoxandra cuspidata* : bonne activité (CI<sub>50</sub> = 10,0 µg/ml) avec peu de données bibliographiques concernant les composés qu'elle renferme.

Les critères bibliographiques et biologiques ont permis de procéder à la sélection des deux plantes les plus actives (*P. cuspidata* et *T. guianensis*), dont l'étude phytochimique bioguidée sera décrite dans les parties D et E.

## **2. Plantes issues de la médecine traditionnelle péruvienne (Quechua)**

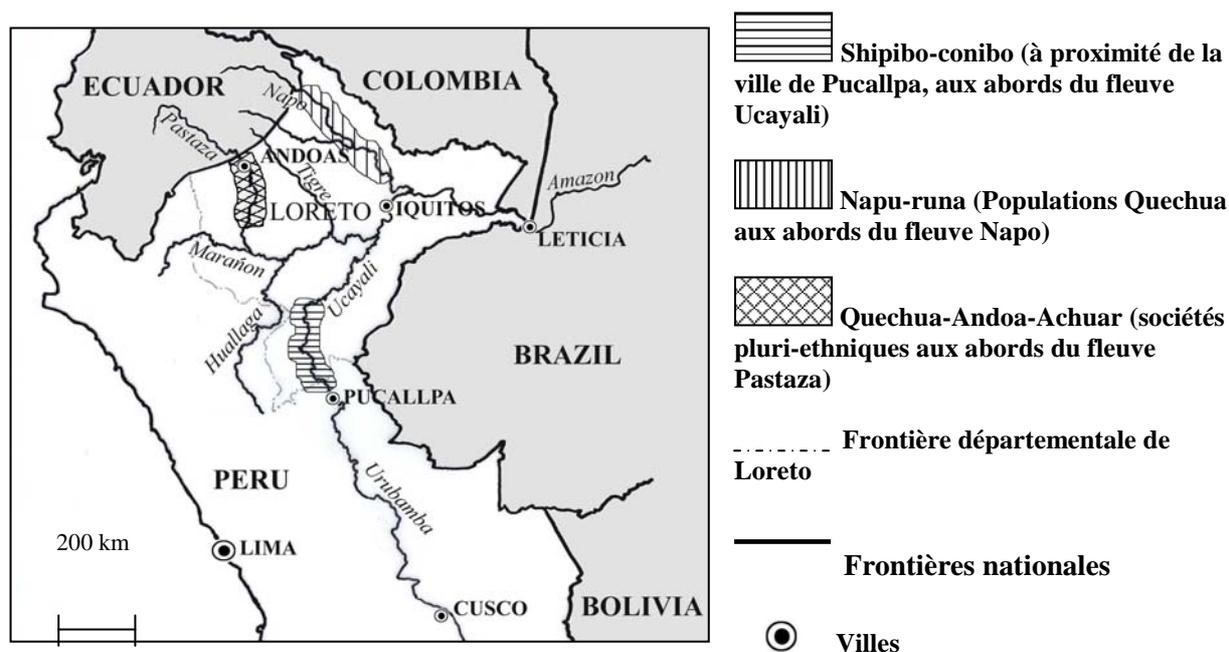
Cette enquête ethnopharmacologique concerne les plantes utilisées en médecine traditionnelle par les Quechua d'Amazonie peuplant les rives des fleuves Pastaza et Napo. Elle a été menée à bien entre 2004 et 2006 en plusieurs étapes, aboutissant à la sélection de diverses plantes actives *in vitro* contre *P. falciparum*.

Ne pouvant juger de l'efficacité d'un type de médecine sans considération préalable des pratiques culturelles attenantes, nous présenterons les sociétés Quechua des basses terres, en détaillant leur conception de la médecine [Etkin, 1988]. Puis nous dresserons l'inventaire complet des espèces testées pour enfin conclure sur l'activité antiplasmodiale de ces plantes.

### **2.1. Présentation des groupes ethniques étudiés**

#### **2.1.1. Contexte général**

Deux groupes Quechua du Pérou ont principalement retenu notre attention lors de cette enquête ethnopharmacologique. Ils occupent deux zones isolées du département de Loreto (Amazonie péruvienne septentrionale) et sont répartis aux abords de deux grands fleuves affluents de l'Amazone : le Napo et le Pastaza (Figure 4).



**Figure 4 : Répartition géographique des zones d'étude**

En dépit des efforts d'évangélisation déployés en période coloniale, les Quechua sont restés fidèles à leurs représentations animistes du monde [Descola, 2005]. Ils comptent environ 3 000 individus pour le Pastaza, 5 000 pour la région du Napo, sur une population de 800 000 habitants dans le département de Loreto et un total national de 27,3 millions de Péruviens. Cette minorité ethnique se compose d'individus originaires de groupes ethniques variés, parfois disparus de nos jours (comme le groupe Andoa, de la famille linguistique Zaparo), réunis en période coloniale dans les missions, où la langue quechua servait de langue véhiculaire pour communiquer. Ils occupent actuellement de vastes territoires amazoniens et entretiennent des relations étroites d'échange et d'intermariages avec les populations indiennes voisines (Achuar et Kandoshi dans la région du Pastaza).

Les Quechua du Napo, plus exactement Kichwa selon la dénomination accordée par les missionnaires, se désignent eux-mêmes par l'expression « Napo runa » (habitants du Napo). Ils sont rassemblés autour d'une mission dominicaine appelée Angoteros, proche de la frontière équatorienne.

Les Quechua du haut Pastaza, s'identifiant comme « Inga », plus isolés géographiquement, résultent d'un extraordinaire brassage de populations indigènes avec lesquels ils co-habitent comme les Achuar et les Kandoshi (groupes Jivaro), et les anciens Andoa.

Ces groupes tirent leur subsistance de l'horticulture (principalement la culture de manioc et de plantain), à laquelle sont associées des activités comme la chasse (les gibiers de prédilection étant le singe, le pécarî, le tapir ...), la pêche et la cueillette. Les principaux

contacts noués avec la société nationale sont ceux établis ponctuellement avec les bûcherons (en particulier sur le Napo), quelques commerçants métis itinérants ou des compagnies pétrolières (sur le haut Pastaza). Les migrations spontanées sont attribuées à la dynamique des échanges interethniques et à la quête de nouvelles ressources naturelles (en gibier par exemple).

## **2.1.2. Contexte culturel**

### **2.1.2.1. Conceptions de la médecine et de la maladie chez les Quechua d'Amazonie.**

#### La médecine traditionnelle Quechua d'Amazonie

Une observation hâtive du mode de vie indigène prêterait à croire que l'environnement, ici la forêt tropicale, contraint l'homme et le modélise socialement et culturellement (théorie du « déterminisme biologique »). Cette observation ne tient pas compte de la capacité d'adaptation des peuples indigènes alors considérés comme passifs, et donc peu aptes à dépasser les contraintes d'un milieu naturel hostile. En réalité, si nous considérons l'exemple des peuples Quechua des basses terres, nous observons qu'ils témoignent non seulement d'une remarquable adaptation à leur environnement, mais qu'ils en possèdent de surcroît une excellente maîtrise empirique et connaissance pratique. Ces savoirs sont associés à un respect de l'équilibre environnemental leur permettant de reproduire l'exploitation de ses ressources. Cette adaptation se manifeste au travers des techniques de pêche, de chasse, de culture... mais aussi des pratiques médicales.

Ces pratiques résultent essentiellement de l'expérience et sont transmises oralement, quelquefois au sein d'une tradition discursive élaborée comme les récits mythologiques. L'efficacité de ce système de transmission des connaissances ne fait nul doute. En effet, nous constatons que chez les Quechua des basses terres, ce savoir n'est pas l'apanage exclusif d'une élite, mais s'étend à l'ensemble des membres d'une même communauté (hommes, femmes et enfants), notamment en ce qui concerne l'usage de nombreuses plantes médicinales. Néanmoins, certaines personnes plus spécialisées comme les chamanes (appelés « Yachak » ou « Banku ») occupent un rôle important dans la médecine traditionnelle et interviennent dans les maladies graves ou inexplicables.

## La maladie chez les Quechua

De manière simplifiée, nous pouvons considérer que les Quechua des basses terres distinguent trois catégories de maladie d'après leur étiologie :

- Les maladies attribuées à des causes sensibles : « unkuy » (sensations de froid, de chaleur, d'humidité...) et dont la symptomatologie reste bénigne. Ces maladies sont généralement soignées par les plantes.
- Les maladies connues sous les termes « pahu », « shinkurana » ou « kutipa » (signifiant la vengeance) causées par la rencontre d'un mauvais esprit (« supay ») se manifestent par des symptômes physiques accompagnés d'un désordre émotionnel. Ces maladies font suite au non respect d'un tabou, par exemple, un chasseur tuant impunément le gibier sans avoir préalablement averti le maître spirituel du gibier, ou bien une femme ayant ses menstruations alors qu'elle se baigne dans la rivière... Ce type de maladie est associé à un certain nombre de croyances animistes Quechua.
- Enfin, les maladies appelées « wiruti », du nom des fléchettes de sarbacane utilisées couramment pour chasser, symbolisent ici un mauvais sort fiché (virtuellement) par un ennemi humain, un chamane, dans le corps de sa victime. L'étiologie de ces maladies est imputée à la sorcellerie.

Dans ces deux derniers cas, guérisseurs ou chamanes sont sollicités, conjointement à l'utilisation des remèdes à base de plantes, de minéraux et d'animaux. Ces étiologies font référence à une notion extériorisante de la maladie faisant appel à des agents pathogènes situés en dehors du corps souffrant (qu'il s'agisse du chamane ennemi ou de l'esprit malveillant).

Cette conception s'appuie sur une représentation particulière de la physiologie humaine. En effet, les Quechua considèrent que le corps humain est animé par trois éléments vitaux dotés de fonctions distinctives et pouvant être localisés dans plusieurs organes :

- Le foie et le cœur (« shunku ») correspondent aux facultés de réflexion (l'intellect) et au principe régissant les humeurs
- La moëlle épinière et l'occiput (« ñukchu ») sont associés à la vigilance.
- Le sommet du crâne et la fontanelle (« korona ») sont associés au « souffle » (« samay ») de l'individu et reflètent l'état de l'âme, par extension l'état de santé de l'individu (un individu atteint de maladie est dit avoir « perdu » son souffle, et le thérapeute indigène sera chargé de souffler du tabac sur le sommet du crâne pour obtenir la guérison).

Les deux organes, foie et cœur, sont curieusement regroupés sous la même dénomination : « shunku », et sont paradoxalement le siège de la raison et des émotions [Iglesias, 1989 ; Iglesias, 1991].

Dans ce contexte culturel, le paludisme fait l'objet d'une double interprétation : En l'absence de gravité des symptômes, il peut être attribué à une cause connue et considéré comme appartenant à la catégorie « unkuy », c'est-à-dire lié à une cause sensible et susceptible d'être soignée par les plantes ou les médicaments « modernes ».

En revanche, si l'accès palustre mène à la mort ou à des souffrances trop élevées, les symptômes sont imputés à un acte de sorcellerie, c'est-à-dire « wiruti ». Dans ce dernier cas, les plantes ne sont alors plus jugées suffisamment efficaces pour obtenir la guérison, cette dernière nécessitant l'accomplissement de rituels chamaniques ayant pour finalité la recherche du « coupable », c'est-à-dire du responsable de l'ensorcellement.

L'étiologie du paludisme chez les Quechua d'Amazonie est donc polyvalente et varie suivant la gravité diagnostiquée.

### **2.1.2.2. Les plantes utilisées par les Quechua**

#### Symbolisme et sélection des plantes de la « Pharmacopée indigène »

La transmission des connaissances chez les Quechua est essentiellement orale et repose sur la communication de savoir faire et de compétences symboliques, tel que l'apprentissage des mythes ou des chants. Cet usage du symbolisme se retrouve dans l'utilisation des plantes, comme l'illustre la théorie des signatures, qui mène à la sélection de plantes dont les caractères morphologiques rappellent ceux de l'organe ou de la partie à traiter...

La sélection des plantes peut également se fonder sur d'autres caractères organoleptiques associés aux propriétés intrinsèques de la plante, telles que son amertume (les « principes amers » tels que *Pagamea guianensis* Aubl.), sa causticité, son goût (piquant...), son odeur...

#### Symboles et taxonomie botanique

Les noms vernaculaires Quechua donnés aux plantes caractérisent les espèces de manière sensible (organoleptique), ou rendent compte de leurs propriétés médicinales et de leur provenance (ce qui est également le cas dans la nomenclature latine).

Etude taxonomique des plantes collectées au cours de notre enquête:

- Taxonomie établie en fonction des caractères organoleptiques :

« Puma kaspi », signifiant arbre-jaguar, en raison de la couleur de l'écorce, le nom latin : *Roucheria punctata* Ducke mentionne aussi cette caractéristique (« ponctuée » à l'image des ocelles caractéristiques du pelage de l'animal).

« Abuta macho » (*Abuta rufescens* Aubl.) signifiant Abuta mâle, en raison de l'aspect dressé de ses rameaux et par opposition à « Abuta hembra » : Abuta femelle (*Abuta grandifolia* (Mart.) Sandwith), aux rameaux courbés.

« Yura wapa » (*Virola calophylla* (Spruce) Warb.), signifiant cumal (nom d'arbre en espagnol régional) blanc.

« Asna panká » (*Cyphomandra hartwegii* (Miers) Walp.) qui signifie feuille mal-odorante.

➤ Taxonomie établie en fonction de la provenance :

« Sacha mangua » (*Grias neuberthii* J.F. Macbr.) espèce pour laquelle le préfixe « sacha » (forêt sauvage) fait référence à un lieu de collecte distant (localisé dans la forêt primaire).

« Palometa wayu » (*Lacistema aggregatum* (P.J. Bergius) Rusby) signifiant fruit de Palometa, une espèce de poisson d'Amazonie (*Mylosoma* sp.). Cette espèce « Palometa wayu » est en effet recherchée à proximité des cours d'eau.

➤ Taxonomie établie en fonction des effets et des indications :

« Chiri kaspi, Chiri sanango » (*Brunfelsia grandiflora* Plow.) signifiant « Arbre du froid », l'infusion des parties aériennes est utilisée comme anti-grippal et anti-inflammatoire.

Dans un système de transmission orale des connaissances, une plante efficace et simple à reconnaître est une plante qui sera mieux retenue dans la « Pharmacopée indigène ». Des conclusions similaires ont été observées dans une enquête ethnopharmacologique menée chez des populations Machiguenga d'Amazonie péruvienne [Shepard, 1999]. L'origine des noms vernaculaires fournit donc de très nombreuses indications sur les espèces sélectionnées (utilisation, identification, origine...)

### Culture et collecte des plantes médicinales

La collecte des plantes médicinales s'effectue en général sur les sites où elles poussent spontanément [Black, 1978]. Cependant, certaines espèces sont également cultivées, afin de garantir un accès permanent et immédiat, pour différentes raisons :

➤ Dans le cas d'une utilisation contre des maladies communes, à l'exemple des plantes possédant des vertus antipyrétiques ou anti-inflammatoires comme : « Chiri kaspi,

Chiri sanango » : *Brunfelsia grandiflora* Plow, ou la « Pirpina » : *Verbena litoralis* Kunth, ou encore la « Patiquina » : *Diffenbachia obliqua* Poeppig.

- D'autres plantes actives et d'usage fréquent peuvent être cultivées, comme les ichtyotoxiques utilisés pour la pêche (« Barbasco », « Maso » et « Waka ») : ex : *Clibadium surinamense* L. (Asteraceae)...
- Les espèces nécessaires en urgence sont également cultivées (remèdes des morsures de serpent, piqûres...)
- Les plantes à usage cérémoniel : la « Guayusa » : *Ilex guayusa* Loes. (Aquifoliaceae): purgatif, vomitif également utilisé contre le paludisme, ou le « Toé » : *Datura arborea* L., hallucinogène [Kohn, 1992].

Les plantations sont limitées à quelques individus dispersés, mais une grande attention est portée à leur position géographique par rapport à d'autres plantes, à la présence de cours d'eau, à l'altitude, à la lumière... La collecte fait l'objet d'un rituel qui accompagne également la préparation, comme l'illustre l'exemple suivant de *Verbena litoralis* [Licuy Yumbo, 1994] :

« Le genre *Verbena* est collecté seulement les nuits de pleine lune entre 23 h et minuit, car ce sont des plantes mystérieuses que l'on utilise entières ». Il existe de nombreuses modalités de préparation de cette plante, associées à des indications variées : expression à froid de la plante entière dans de l'eau de vie avec du citron, ou expression simple du jus des feuilles dans l'eau. Ces préparations sont utilisées comme antitussif, émétisant, vermifuge et surtout comme anti-pyrétique (plus particulièrement dans les accès palustres).

La préparation d'une plante est un procédé incontournable, transformant la plante en médecine. Une fois le remède préparé, la manière rituelle dont il est administré est également très importante (chant, mouvements, paroles...) ce qui permet d'établir un lien entre le patient et le monde surnaturel, notamment dans le cas des maladies graves de type « Pahu » ou « Wiruti ».

### 2.1.3. Méthode d'enquête ethnopharmacologique

Une recherche bibliographique (au Pérou) a tout d'abord permis la sélection d'une cinquantaine d'espèces utilisées par différents groupes ethniques contre la fièvre ou la malaria. Puis, grâce à la collaboration avec la Faculté de Pharmacie d'Iquitos (Universidad Nacional de la Amazonía Peruana : U.N.A.P.) et suite à d'autres recherches bibliographiques menées en France, une vingtaine d'espèces furent sélectionnées pour leur originalité et partagées avec la U.N.A.P.. Parallèlement à cette sélection essentiellement bibliographique, plusieurs enquêtes ethnopharmacologiques ont été menées dans différentes zones d'Amazonie

péruvienne (région de Loreto) le long des fleuves Napo, et Pastaza, parmi des ethnies principalement Quechua (« Napo runa » et « Inga ») ou Jivaro (Achuar, Kandoshi), et autour d'Iquitos (capitale de Loreto essentiellement peuplée de populations métisses).

La méthode d'enquête fut celle dite de « l'observation participante » menée à bien en langue quechua, kaxakati ou espagnole suivant les locuteurs, et cela grâce à l'anthropologue Andréa-luz Gutierrez-Choquevilca. Les informations demandées concernaient principalement :

- la description des espèces suivant leur provenance, leur dénomination locale et la drogue utilisée
- le contexte des collectes (à l'occasion d'une expédition de chasse ou de pêche, selon le moment de la journée, la saison)
- le mode de préparation
- les indications thérapeutiques.

Les plantes recherchées étaient celles utilisées contre les symptômes du paludisme qui sont, pour les Quechua : la fièvre (« rupa » : sensation de chaleur), le tremblement (« chukchu aycha »), les douleurs du cœur et du foie (« shunku nanay »), les maux de tête (« uma muyurin »), la perte de vision (« yana rikurin » : « cela s'obscurcit »).

Le contexte dans lequel ces enquêtes ont eu lieu se présentait sous la forme d'un échange de connaissances et de savoir faire. En effet l'intégration dans chacun des groupes ethniques grâce à la participation à certains travaux collectifs (culture, chasse, pêche, construction des maisons...) ou grâce au soutien médical que je fournissais, a permis de créer une relation d'échange et de confiance favorisant l'apprentissage des diverses pratiques médicales locales. Enfin, il faut préciser que deux des plantes étudiées (*Mikania congesta* et *Pagamea guyanensis*) ne sont pas issues d'enquêtes réalisées chez les Quechua, mais constituent des remèdes indiqués par les populations métisses aux abords d'Iquitos, capitale du département de Loreto, et dont l'une est décrite comme antipyrétique par J. A. Duke dans l' « Amazonian Ethnobotanical Dictionary » [Duke, 1994].

## **2.2. Monographies simplifiées des plantes étudiées**

Les fleurs sont parfois très peu décrites car les périodes de collecte n'ont pas permis leur observation et la littérature ne les mentionne pas ou très peu.

Les photos ont été prises lors de la collecte ou à posteriori à l'herbier de la UNAP (Iquitos), certaines d'entre elles proviennent également du site Internet du muséum de Chicago (<http://www.fm2.fieldmuseum.org>).

Les dénominations ainsi que les répartitions géographiques de chaque espèce, ont été obtenues sur le site International Plant Name Index (<http://www.ipni.org>).

Les informations collectées sur le terrain ont été complétées par des données bibliographiques afin de fournir un maximum de renseignements sur les espèces sélectionnées.

Les plantes d'indication anti-paludique sont des espèces que les Quechua utilisent contre au moins deux des symptômes décrits précédemment.

***Abuta rufescens* Aubl.**

(021792)

**Menispermaceae**



Tige enroulée



Partie aérienne

**Synonymes :** Aucun

**Noms vernaculaires**

“Pancha muca” (shipibo-conibo de l’Ucayali), “Abuta macho, Abuta amarillo” (Abuta mâle ou Abuta jaune)

**Description botanique**

C’est une liane des plus grandes de sa famille, à rameaux et pétioles tomenteux. Le limbe des feuilles, largement ovale puis acuminé, est lisse en dessus sauf à la base des nervures, et poilu grisâtre en dessous. Les nervures, saillantes, sont palmati-3-nervées. Les fleurs mâles et femelles sont trimères velues et jaunes. Le fruit est une drupe ovale glabre.

**Répartition géographique**

Guyane, Pérou, Amérique du sud tropicale

**Utilisation traditionnelle**

Décoction de la tige ou de l’écorce utilisée dans le curare, ou contre les ulcères de l’estomac et le paludisme

**Données phytochimiques**

**Alcaloïdes :** Isoquinoléines (azuléno-isoquinoléines, indéno-isoquinoléines...), dibenzoquinoléines (Iménine), oxo-aporphines (splendiline, homomoschatoline...)

**Drogues collectées :** Ecorce et feuilles

**Bibliographie :** [Krukoff, 1938 ; Lemée, 1955 ; Cava *et al.*, 1975 ; Boger, 1984 ; Arevalo, 1994 ; Steele, 1999, 2002] ([http : //www.flora.brasiliensis.cria.org.](http://www.flora.brasiliensis.cria.org))

**Cassia loretensis Killip & J. F. Macbr. Ex Killip.**

(029585)

**Fabaceae**  
(Caesalpinaceae)



Feuille



Ecorce du tronc

**Synonymes**

*Senna loretensis* Killip.

**Noms vernaculaires**

Waranka (Quechua du Pastaza)

**Description botanique**

C'est un arbre poussant au bord des cours d'eau pouvant atteindre une taille élevée. Ses rameaux très légers et son tronc sont cannelés voir quadrillés de petites crêtes d'épines. Les feuilles sont paripennées et munies de très nombreux petits folioles opposés. L'inflorescence, en fascicules terminaux, est constituée de petites fleurs discrètes pentamères aux pétales inégaux donnant naissance à des gousses déhiscentes.

**Répartition géographique**

Amazonie péruvienne (région de Loreto), Sud Ouest Amazonie

**Utilisation traditionnelle**

Décoction de l'écorce comme anti-pyrétique

**Données phytochimiques :**

La composition chimique de cet arbre n'a pas été publiée jusqu'à présent.

**Drogues collectées :** Ecorce et feuilles

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; Iglesias, 1989 ; Rutter, 1990]

***Cyphomandra hartwegii***  
**(Miers) Walp.**  
 (028197)

**Solanaceae**



Partie aérienne



Fruit



Feuilles et bourgeon apical

**Synonymes :** Aucun

**Noms vernaculaires**

« Asna panka » (Quechua du Pastaza) signifiant « feuille mal-odorante »

**Description botanique**

C'est un arbre à feuilles alternes largement lancéolées. L'inflorescence est terminale, en panicule avec des fleurs pentamères à corolle soudée à la base et donnant naissance à des baies lisses ovales-cylindriques de 8 cm de long sur 4 cm de diamètre et divisées en deux loges. La pulpe rouge est comestible, de saveur acide, elle entoure des graines irrégulièrement réniformes et très aplaties.

**Répartition géographique**

Pérou, Equateur, Colombie, en zone tropicale

**Utilisation traditionnelle**

Infusion des feuilles contre les troubles hépatiques et comme anti-pyrétique

**Données phytochimiques**

Cette espèce n'a pas encore été chimiquement analysée.

Rq : Une autre espèce du même genre (*Cyphomandra betacea* Sendt.) a déjà été étudiée, démontrant la présence de vitamines (C et caroténoïdes) dans les fruits, et d'alcaloïdes dans l'écorce et les racines (de type atropinique, ou des amides non cycliques...).

**Drogues collectées :** Ecorce, feuilles, fruits, racines

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; Evans, 1972 ; Bertoni, 1990 ; Boyes, 1997]

***Eryngium foetidum* L.**  
(033895)

**Apiaceae**



Parties aériennes

**Synonymes**

*Eryngium yuccaefolium* Michx.

**Noms vernaculaires**

« Sacha kulantro » (Quechua du Napo et du Pastaza), équivalent au « Coriandre sauvage »

**Description botanique**

C'est une plante herbacée d'environ 30 cm de hauteur à feuilles étroitement oblongues munies de grosses dents. L'inflorescence, en tête, est cylindrique et composée de petites fleurs blanches dans des bractées foliacées spinescentes.

**Répartition géographique**

Cette espèce est largement répandue dans le monde : en Inde, en Asie, en Floride, en Egypte, en Amérique du Sud tropicale...

**Utilisations traditionnelles**

Les parties aériennes sont utilisées comme assaisonnement et la décoction des feuilles est employée contre les diarrhées, les troubles de l'estomac et le paludisme.

**Données phytochimiques**

Présence de terpènes, stérols,  $\alpha$ -cholestérol, campestérol, brassicastérol,  $\beta$ -sitostérol, avénastérol, clerostérol et leurs dérivés, isolés des feuilles. L'huile essentielle contient des dérivés alcanes et alkènes comme le dodécenal, dodécenol... ainsi que de l'eugénol, de la  $\beta$ -ionone et des dérivés du triméthyl-benzaldéhyde. D'autres composés sont également présents dans les feuilles tels que des saponosides et des flavonoïdes.

**Drogue collectée : Feuilles**

**Bibliographie : [Lemée, 1955 ; Yeh, 1974 ; Forgacs, 1983 ; Boger, 1984 ; Filadoro, 1991 ; Pino, 1997 ; Garcia, 1999 ; Sáenz, 1999 ; Cardozo, 2004 ; Eyres, 2005]**

***Grias neuberthii***

**J.F. Macbr.**

(033652)

**Lecythidaceae**



Fleur



Feuille et rameau



Pulpe du fruit et graine

**Synonymes :** Aucun

**Noms vernaculaires**

« Sacha mangua, Pitun » (Quechua du Napo et du Pastaza) signifiant mangue de la forêt

**Description botanique**

C'est un arbre de taille moyenne produisant un fruit comestible ressemblant à une petite mangue. Les feuilles sont alternes, simples, penninervées et oblongues-lancéolées. Les fleurs, jaunes, sont disposées en grappes axillaires ou terminales, elles possèdent 4 pétales et un androcée en anneau (androphore) couronnant le stigmate.

**Répartition géographique**

Dans la région de Loreto (Pérou, zone tropicale) et le Sud-Ouest de l'Amazonie

**Utilisations traditionnelles**

La décoction de l'écorce de tige est utilisée comme émétisant, apéritif, anti-pyrétique et contre l'anémie. La racine râpée dans l'eau chaude est employée contre les parasites intestinaux. La cendre de l'écorce est appliquée sur les piqûres d'insectes et les champignons. Le fruit est comestible.

**Données phytochimiques**

Seul le fruit a fait l'objet d'études phytochimiques, révélant la présence de flavonoïdes (catéchol, daidzéine) et d'acides organiques (cinamique, ferulique, caféique, sinapinique) ...

**Drogue collectée :** Ecorce

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; San Sebastian, 1995 ; Cerón, 1998 ; Garcia De Sotero, 2003]

***Lacistema aggregatum* (P. J. Bergius) Rusby**

(027242)

**Lacistemaceae**



Rameau feuillu

**Synonymes**

*Lacistema myricoides* Sw., *Piper aggregatum* Berg., *Piper fasciculare* Rudge (Piperaceae)

**Noms vernaculaires**

« Huacapurana, Palometa wayu, trompo huayo » (Métis), « Kapawari muyu » (Quechua) signifiant « fruit ou oeuf de poisson »

**Description botanique**

C'est un arbre de taille moyenne muni de feuilles oblongues-elliptiques acuminées alternes et pétiolées. L'inflorescence de couleur vert-jaunâtre est disposée en épis axillaires de 2 cm groupés par 7 ou plus. Les fleurs sont hermaphrodites avec 4 sépales irrégulièrement ovales denticulés, une seule étamine, un ovaire à 3 loges. Le fruit est une capsule à trois valves longue de 8 mm, rose foncée et de forme ellipsoïdale.

**Répartition géographique**

Amérique du Sud tropicale, Antilles, Floride

**Utilisations traditionnelles**

Les fragments de bois et d'écorce sont macérés dans du rhum ou préparés par décoction dans l'eau. L'extrait est utilisé contre les rhumatismes et la fièvre.

**Données phytochimiques**

Aucune étude chimique de l'espèce n'a été publiée à ce jour.

**Drogues collectées :** Ecorce et feuilles

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; Rutter, 1990]

***Mikania congesta* DC.**

(025548)

**Asteraceae**



Partie aérienne fleurie



Partie aérienne

**Synonymes**

*Mikania scandens* (var. *congesta*) DC., *Mikania micrantha* Kunth, *Willoughbia scandens* Kuntze (var. *congesta*)

**Noms vernaculaires**

« Sanquillo, Yana anku » (Quechua du Napo)

**Description botanique**

C'est une plante herbacée portant des feuilles opposées pétiolées et hastées (en fer de lance). L'inflorescence se présente sous forme de panicules terminaux et axillaires à long pédoncule, formée de corymbes de petites fleurs avec des bractées violacées. Les fleurs sont blanches, donnant naissance à des akènes munis d'aigrettes.

**Répartition géographique**

Amazonie (Brésil), Floride

**Utilisations traditionnelles**

L'infusion des parties aériennes est utilisée comme laxatif et anti-pyrétique

**Données phytochimiques**

Seuls des sesquiterpènes dilactones (dérivés du mikanolide, du scandénolide, miscandénine...) ont été isolés des parties aériennes de cette espèce.

**Drogue collectée :** Feuilles

**Bibliographie :** [Herz, 1970]

***Pagamea guianensis* Aubl.**  
(035904)

**Rubiaceae**



Partie aérienne avec fruit séché

**Synonymes:** Aucun

**Noms vernaculaires**

« Tollinche ou Charvein » (Maroni, Guyane)

**Description botanique**

C'est un arbre de taille moyenne à tiges pubères puis glabres. Les feuilles d'environ 2 cm sur 8 cm sont opposées et lancéolées acuminées. L'inflorescence se situe à l'aisselle des rameaux sous forme de capitules de fleurs vert-jaunâtre. La corolle est quadri ou penta-mère mesurant avec son tube ½ cm. Le fruit est une drupe de 5 mm sur 4 mm verte à bleu foncé.

**Répartition géographique**

Amérique du Sud tropicale

**Utilisation traditionnelle**

Cette plante appartient à un genre souvent employé comme hallucinogène. Elle est aussi considérée comme « principe amer ».

**Données phytochimiques**

Ce genre n'a pas encore fait l'objet d'étude phytochimique.

**Droque collectée :** Feuilles

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; De Smet, 1985]

***Pithecellobium laetum* Benth**

(021229)

**Fabaceae**  
(Mimosaceae)



Feuilles et fruits

**Synonyme**

*Abarema laeta* Benth, *Mimosaceae inga laeta* (Fabaceae)

**Noms vernaculaires**

“Sirimpachi” (Quechua du Pastaza), “Chunta ruku panká” (Quechua du Napo) “Shimbillo”

**Description botanique**

C'est une liane à petits rameaux anguleux sans nœud possédant des côtes fibreuses détachables. Les feuilles sont bi-foliolées avec une vrille et des stipules. Les fleurs sont en panicules terminaux avec des calices coriaces, tronqués, et une corolle en entonnoir. Le fruit est une capsule épaisse rouge renfermant des graines aplaties et bleues.

**Répartition géographique**

Amérique du Sud tropicale

**Utilisation traditionnelle**

L'infusion des parties aériennes est utilisée contre les crises de paludisme.

**Données phytochimiques**

Plante peu connue, il n'existe pas encore d'étude chimique concernant le genre.

**Drogue collectée :** Parties aériennes

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; Leonard, 1967]

***Roucheria punctata* Ducke**

(033640)

**Linaceae**



Rameau feuillu

**Synonyme**

*Hebepetalum punctatum* Ducke

**Noms vernaculaires**

« *Puma kaspi*, *Puma sacha* » (Quechua du Napo) signifiant arbre jaguar ou jaguar de la forêt

**Description botanique**

Arbre de taille moyenne à feuilles pétiolées, simples, lancéolées et alternes. Les fleurs sont régulières hermaphrodites pentamères à nombreuses étamines. Le fruit est une drupe.

**Répartition géographique**

Loreto (Amazonie péruvienne), Brésil, Colombie, Equateur

**Utilisations traditionnelles**

La décoction de l'écorce est utilisée comme anti-diarrhéique et anti-paludique.

**Données phytochimiques**

Cette espèce n'a pas encore fait l'objet d'étude phytochimique.

**Droque collectée :** Ecorce

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; Duke, 1994]

***Sabicea villosa* Willd. ex Roem. et Schult.**  
(024118)

**Rubiaceae**



Parties aériennes

**Synonymes**

*Sabicea aspera* Aubl., *Sabicea hirsuta* H.B.K.

**Noms vernaculaires**

« Curihjau, Huasca mullaca » (Quechua du Napo)

**Description botanique**

Liane à petits rameaux d'abord velus grisâtres puis pubescents, munis de feuilles opposées elliptiques-oblongues acuminées et poilues sur les deux faces. Les fleurs, tétramères, blanches à roses, sont petites, sessiles et disposées en panicule. Elles donnent naissance à de petites baies violettes.

**Répartition géographique**

Amazonie

**Utilisations traditionnelles**

L'infusion des feuilles est administrée contre les diarrhées, les troubles de l'estomac et contre le paludisme.

**Données phytochimiques**

Aucune étude chimique de cette espèce n'a encore été publiée.

**Droque collectée :** Parties aériennes

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; Duke, 1994]

***Verbena litoralis* Kunth**  
(033670)

**Verbenaceae**



Partie aérienne fleurie

**Synonymes**

*Verbena littoralis* Kunth. (écriture plus commune mais mal orthographiée)

**Noms vernaculaires**

« Pirpina », signifiant verveine (Quechua du Napo et du Pastaza)

**Description botanique**

C'est une plante herbacée ressemblant à *Verbena officinalis* L. mais avec des feuilles plus larges, lancéolées et dentelées. Ces feuilles, opposées, n'ont pas de pétioles. L'inflorescence est longue, terminale, en épis de petites fleurs pentamères violettes. Le fruit, inclus dans le calice, se fend en 2 coques à maturité contenant des graines sans albumen.

**Répartition géographique**

Amérique du Sud et Asie, dans les zones de climat tropical

**Utilisations traditionnelles**

Expression à froid dans de l'eau de vie avec du citron de la plante entière, ou expression simple dans l'eau du jus des feuilles ; ces préparations sont utilisées comme antitussif, émétisant, vermifuge et surtout anti-pyrétique (plus particulièrement lors de crises de paludisme).

**Données phytochimiques**

Les publications mentionnent la présence d'iridoïdes simples ou glycosilés (verbenaline brasoside...) de caféoyl-glycoside (verbascoside), d'alcaloïdes, d'huile essentielle, de chalcones simples ou dimérisées (verbenachalcone), de stérols, de naphtoquinones, de vitamines A et B, de tritépènes (acides ursoliques, oléanolique...) isolés des parties aériennes de cette espèce.

**Drogue collectée :** Parties aériennes

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; Iglesias, 1989 ; Mejía, 1996 ; Li, 2001 ; Li, 2003a, b]

***Virola calophylla* (Spruce)**

**Warb.**

(035901)

**Myristicaceae**



Rameau feuillu

**Synonymes**

*Myristica calophylla* Spruce, *Palala calophylla* Kuntze

**Noms vernaculaires**

«Yura wapa », signifiant « Cumal blanc » (Quechua du Napo et du Pastaza)

**Description botanique**

Cet arbre possède des feuilles ob-ovales penninervées alternes relativement grandes (jusqu'à 30 cm sur 15 cm). Les fleurs, dioïques, sont disposées en panicules et donnent naissance à des fruits arrondis.

**Répartition géographique**

Amérique du Sud (Amazonie), Brésil, Equateur, Colombie

**Utilisations thérapeutiques**

La décoction du bois est utilisée contre les troubles de l'estomac, de la vésicule biliaire et comme anti-paludique. En usage externe, elle est utilisée contre la gale et les mycoses. Les groupes Bora et Huitoto du Pérou chiquent ou prisent la poudre de bois pour ses propriétés hallucinogènes.

**Données phytochimiques**

L'écorce et les feuilles ont déjà fait l'objet d'études phytochimiques qui ont mis en évidence la présence de composés psychotropes comme des dérivés de tryptamine, carboline, et présence de nicotine. Autres composés : stérols, néolignanes, chalcones...

Rq : Une espèce voisine (*Virola surinamensis* Role) possède une huile essentielle dont les propriétés anti-paludiques, dues à des sesquiterpènes (nérodiol), ont été démontrées.

**Drogues collectées :** Ecorce et feuilles

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; Alvarez, 1987 ; Miles, 1987 ; Constanza, 1998 ; Lopes, 1999]

***Zygia latifolia* Fawc. et Rendle**  
(021217)

**Fabaceae**  
(**Mimosaceae**)



Fruit et feuilles (*Zygia latifolia*)



Feuilles (« Yutsu »)

**Synonymes**

*Albizzia latifolia* Boiv., *Mimosa latifolia* L., *Pithecellobium latifolium* Benth.

**Noms vernaculaires**

« Yutsu » (Quechua du Pastaza)

**Description botanique**

C'est un arbre glabre muni de feuilles pétiolées bipennées à 3 ou 5 folioles acuminés. L'inflorescence est en capitule ou en épis dense de petites fleurs sessiles roses qui donneront naissance à des gousses falciformes.

**Répartition géographique**

Amérique du Sud (Amazonie), Antilles...

**Utilisations thérapeutiques**

L'infusion issue des feuilles est employée comme émétisant et anti-pyrétique.

**Données phytochimiques**

La plante contiendrait des alcaloïdes qui n'ont pas encore été identifiés.

**Drogue collectée :** Parties aériennes

**Bibliographie :** [Lemée, 1955 ; Leonard, 1967 ; Rutter, 1990]

Rq. : Il existe plusieurs espèces portant le nom vernaculaire de Yutsu, ou llutsu. Il se pourrait que l'espèce considérée dans cette monographie ne soit pas la même que celle désignée par les Quechua ; en revanche, il est certain que l'espèce testée est *Zygia latifolia*.

D'autres plantes ont été collectées et testées mais leur étude fut interrompue en raison de la publication de leurs activités par une autre équipe de recherche [Kvist, 2006]. La similitude des résultats obtenus par cette équipe a permis de valider notre travail. Parmi ces espèces, quelques unes possèdent une activité antiplasmodiale *in vitro* (CI<sub>50</sub> des extraits < 30 µg/ml) mais n'ont pas encore donné lieu à un travail phytochimique bioguidé. Il s'agit des espèces suivantes :

*Doliocarpus dentatus* Standl (Dilleniaceae), *Campsiandra angustifolia* Spruce (Fabaceae) [Kvist, 2006], *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae) [Krettli, 2001], *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) [Mejía, 1996 ; Lewis, 1999] et *Isertia hypoleuca* Benth (Rubiaceae) [Youngken, 1970].

D'autres plantes ont également été mises de côté et réservées comme sujets d'études pour l'Université d'Iquitos (UNAP).

### 2.3. Extractions et activités biologiques

Chacune des drogues provenant des 14 plantes précédentes furent traitées 2 fois (= 2 x 100 ml) par 3 solvants successifs à 30°C :

- hexane (permettant d'extraire une grande partie de pigments tels que les chlorophylles ainsi que les substances les plus apolaires).
- dichlorométhane
- méthanol (permettant l'extraction de composés plus polaires).

Nous avons choisi ce protocole d'extraction afin d'obtenir un maximum de composés représentatifs de la totalité chimique de la plante. Ainsi, certaines activités antiplasmodiales *in vitro* ont pu être caractérisées sur ces extraits alors que les préparations traditionnelles n'en présentaient que peu.

Les 63 extraits obtenus furent testés *in vitro* sur une souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* (FcB1) à des concentrations de 10 et 50 µg/ml avec détection à l'hypoxanthine tritiée. Cette technique de détection par radio-marquage, plus sensible que la technique colorimétrique précédemment utilisée pour les plantes de Guyane (test LDH, ou XTT) est détaillée dans la partie « Matériel et méthodes ». Toute concentration inhibitrice à 50% (CI<sub>50</sub>) supérieure à 50 µg/mL ayant été choisie comme inactive sur le parasite *in vitro*.

Un extrait aux propriétés anti-parasitaires ne pouvant être applicable dans un protocole thérapeutique que s'il est faiblement toxique, la cytotoxicité de chaque extrait actif a été testée sur cellule humaine (cellules tumorales du sein : MCF7). Nous avons ainsi obtenu l'index de sélectivité de chaque extrait correspondant au rapport cytotoxicité / activité antiplasmodiale.

Les tests biologiques effectués ont été suffisamment reproductibles pour limiter le nombre d'expériences à deux séries.

**Tableau 2 : Activités antiplasmodiales (IC<sub>50</sub> < 50 µg/ml) et index de sélectivité des extraits.**

Drogues actives	Extraits	Activité <i>in vitro</i> sur <i>P.falciparum</i> FcB1 (2) <sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Cytotoxicité (2) <sup>b</sup> CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Index de sélectivité <sup>a</sup> sur FcB1
<i>Abuta rufescens</i> Aubl. (Menispermaceae), écorce et feuilles	E CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2,3 ± 0,4 <sup>c</sup>	22,5 ± 4,5	9,6
	E MeOH	3,8 ± 0,3	44,0 ± 3,0	11,5
	F CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7,9 ± 0,1	36,5 ± 3,5	4,6
	F MeOH	3,2 ± 0,2	> 50,0	>15,6
	F Hex	28 ± 4,0	35	1,3
<i>Cyphomandra hartwegii</i> (Miers) Walp. (Solanaceae), écorce	F CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10,0 ± 4	33,0 ± 0,5	3,3
	F Hex	32,2 ± 8,8	38,0 ± 3,0	1,3
	R CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30,5 ± 12,5	29	1,0
<i>Eryngium foetidum</i> L. (Apiaceae), feuilles	F CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	37,0 ± 8	28,3 ± 4,8	0,8
<i>Grias neuberthii</i> J.F. Macbr. (Lecythidaceae), écorce	E MeOH	22,0 ± 0,0	> 50,0	> 2,2
<i>Lacistema aggregatum</i> (P. J. Bergius) Rusby (Lacistemaceae), écorce	E CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7,4 ± 2,5	41,0 ± 1,0	5,5
<i>Pagamea guianensis</i> Aubl. (Rubiaceae), feuilles	F CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	18,5 ± 1,5	31,0 ± 3,0	1,7
<i>Sabicea villosa</i> Willd. ex Roem. & Schult. (Rubiaceae), parties aériennes	PA Hex	5,3 ± 1,1	> 50,0	> 9,5
<i>Virola calophylla</i> (Spruce) Warb. (Myristicaceae), écorce	E CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4,3 ± 0,4	35,5 ± 0,5	8,3
	CQ <sup>d</sup>	0,14	> 100,0	> 500,0
	Dox <sup>e</sup>	ND	0,4	ND

<sup>a</sup> Index de sélectivité: CI<sub>50</sub> MCF7/CI<sub>50</sub> FcB1

<sup>b</sup> Nombre d'expériences

<sup>c</sup> ± écart type.

<sup>d</sup> CQ, chloroquine ; témoin positif dans l'inhibition de croissance *P. falciparum*.

<sup>e</sup> Dox, doxorubicine ; témoin positif dans l'inhibition de croissance des cellules MCF7

E : écorce, F : feuilles, PA : parties aériennes, R : racines

Détection à l'hypoxanthine tritiée

## 2.4. Conclusion

Parmi les 63 extraits testés en duplicata, 14 se sont révélés actifs contre *P. falciparum* avec des  $CI_{50} < 40 \mu\text{g/ml}$ . Le rendement obtenu (8 espèces végétales actives sur 14 testées) justifie l'étude réalisée et confirme la qualité des connaissances médicales indigènes.

Cinq espèces sont particulièrement intéressantes en raison de la sélectivité de leurs effets, il s'agit de *A. rufescens*, *L. aggregatum*, *V. calophylla*, *C. hartwegii* (extraits dichlorométhane) et *S. villosa* (extrait hexanique). En effet, les  $CI_{50}$  de ces extraits sur *P. falciparum* sont comprises entre 4,3 et 10  $\mu\text{g/ml}$  pour des cytotoxicités faibles ( $CI_{50} : > 35,5 \mu\text{g/ml}$ ), correspondant à des index de sélectivité supérieurs à 3,3.

L'étude bibliographique de ces espèces et de leurs genres révèle qu'aucune de ces plantes n'a encore été travaillée pour ses propriétés anti-paludiques. Cependant, *A. rufescens* renferme des bisbensyl-isoquinoléines, composés potentiellement anti-paludiques, et cette espèce appartient au même genre que *Abuta grandifolia* Mart. déjà étudiée pour ce type de propriété. Concernant *V. calophylla*, des études bioguidées sur une espèce voisine (*Virola surinamensis* Role) ont démontré la présence de sesquiterpènes comme le nérodiol responsables des propriétés anti-paludiques de l'huile essentielle de cette espèce.

Les 3 plantes les plus originales et actives restent donc : *C. hartwegii*, *L. aggregatum*, et *S. villosa*. Ces activités sont particulièrement intéressantes car elles concernent une souche de *P. falciparum* chloroquino-résistante, témoignant ainsi d'un avantage thérapeutique par rapport à la quinine classiquement utilisée.

# D      ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE

## BIOGUIDÉE DE *PSEUDOXANDRA*

### *CUSPIDATA* Maas

## 1. Description botanique

### 1.1. Situation phylogénique (Figure 8)

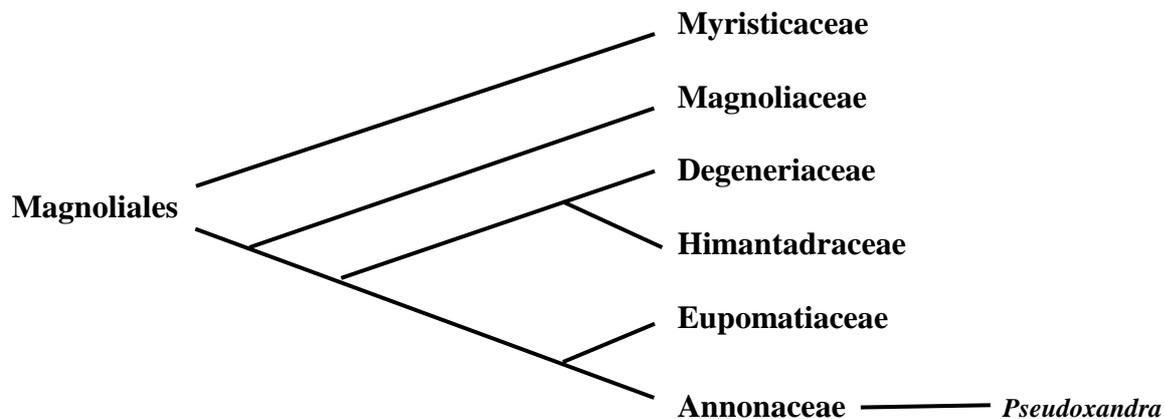


Figure 8 : Position systématique du genre *Pseudoxandra* au sein des Magnoliales

(<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/>)

### 1.2. Classification (<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/>)

<b>Embranchement :</b>	Spermatophytes
<b>Sous-embranchement :</b>	Angiospermes
<b>Classe :</b>	Dicotylédones
<b>Sous-classe :</b>	Dialypétales
<b>Série :</b>	Thamiflores
<b>Sous-série :</b>	Polystémones
<b>Ordre :</b>	Magnoliales
<b>Famille :</b>	Annonaceae
<b>Genre :</b>	<i>Pseudoxandra</i> R. E. Fr.
<b>Espèce :</b>	<i>Pseudoxandra cuspidata</i> Maas

### 1.3. Description et usage traditionnel

Il s'agit d'un arbre pouvant atteindre 30 m de hauteur avec un tronc n'excédant pas 30 cm de diamètre. Les tiges sont couvertes de longs poils blancs lorsqu'elles sont jeunes, devenant rapidement glabres en vieillissant.

La feuille, en position alterne, possède un pétiole de 4-6 sur 1-1,5 mm et un limbe étroitement elliptique de 10-13 sur 3-4 cm. Le limbe est glabre ou plus rarement couvert de très longs poils sur sa face supérieure avec un apex longuement acuminé. Les nervures secondaires (15 à 20 paires) sont difficilement distinguables des nervures tertiaires ; la nervure marginale est très proche de la marge (1 mm) (Figure 9).

L'inflorescence cymeuse pauciflore, axillaire est supportée par un pédicelle de 2-5 sur 1-1,3 mm. La fleur est composée de 5 sépales soudés sur le tiers de leur longueur pouvant atteindre 1,5 mm. Les 5 pétales ovales à elliptiques, de 5 à 7 mm de long, sont verts lorsqu'ils sont jeunes.

Les fruits, matures en avril-juillet, sont des baies subglobuleuses de 10 à 20 mm de diamètre, avec un apicule (apex brusquement rétréci en courte pointe) latéral vert de moins de 1 mm de long et coloré en jaune-orangé devenant noir en séchant. Le stipe (portant le fruit) mesure 15 mm de long sur 2 mm de diamètre.

Cet arbre grandit en forêt de sol ferme et de faible altitude [Gentry, 1993].



Figure 9 : Feuilles et tronc de *Pseudoxandra cuspidata* Maas (collecte de l'écorce)

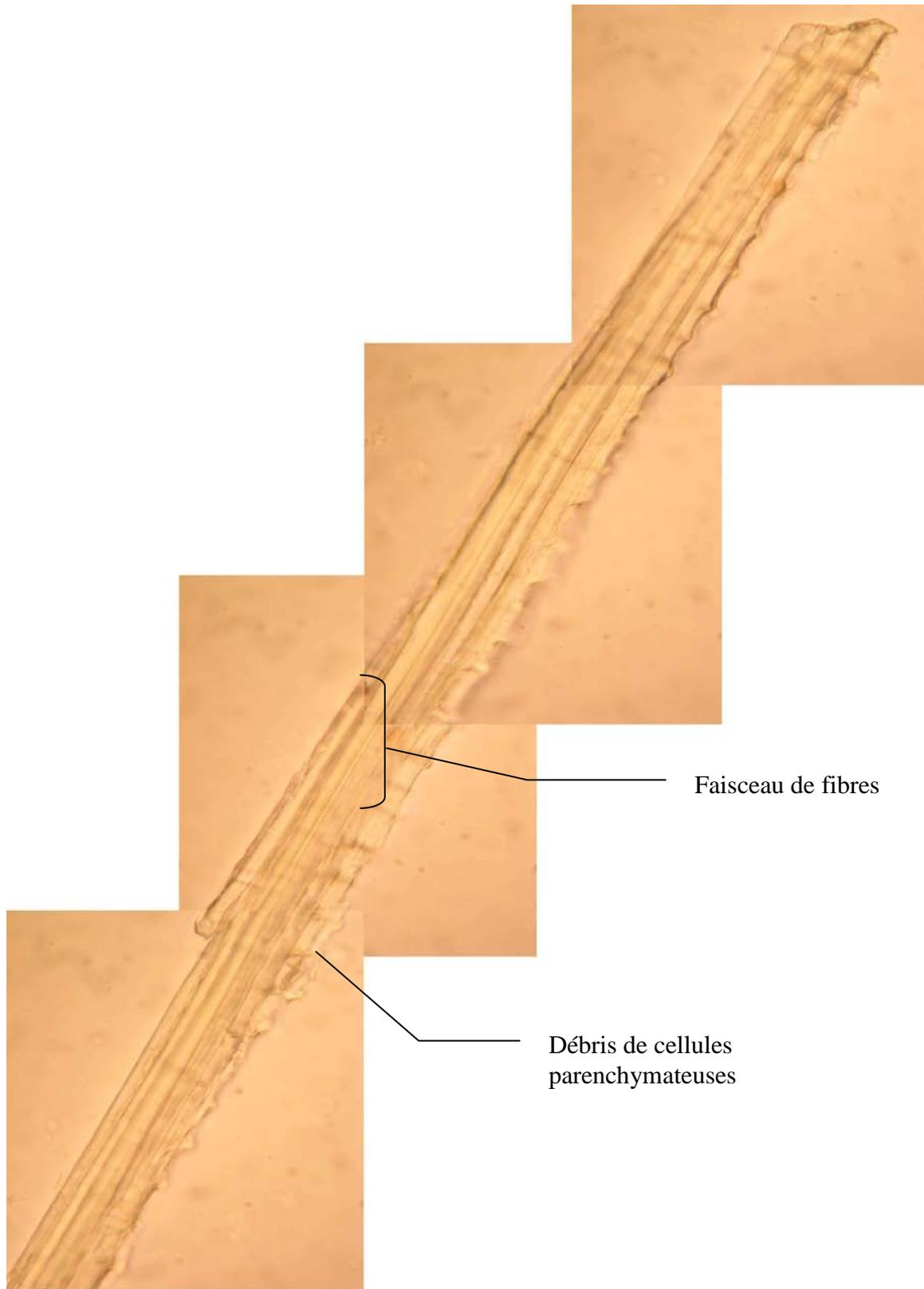
La partie traditionnellement utilisée en Guyane est l'écorce préparée en décoction (200 g bouillis dans 500 ml d'eau pendant 15 minutes) [Bertani, 2005]. Les Wayàpi et les Palikur sont les principaux groupes ethniques utilisant cette drogue contre le paludisme.

## **Description de la poudre d'écorce de *P. cuspidata***

Une faible quantité de poudre est déposée sur une lame de microscope en présence de Réactif lactique (**X<sup>ème</sup> Pharmacopée française**) puis recouverte d'une lamelle et chauffée.

Les éléments prédominants caractérisant la poudre d'écorce de *P. cuspidata* sont :

- de nombreuses fibres longues (Figure 10)
- des nodules de cellules scléreuses liées par des canalicules (Figure 11)
- du suber (Figure 12)
- des amas de cellules parenchymateuses (Figure 13)



**Figure 10 : Faisceau de fibres (G : x 400)**



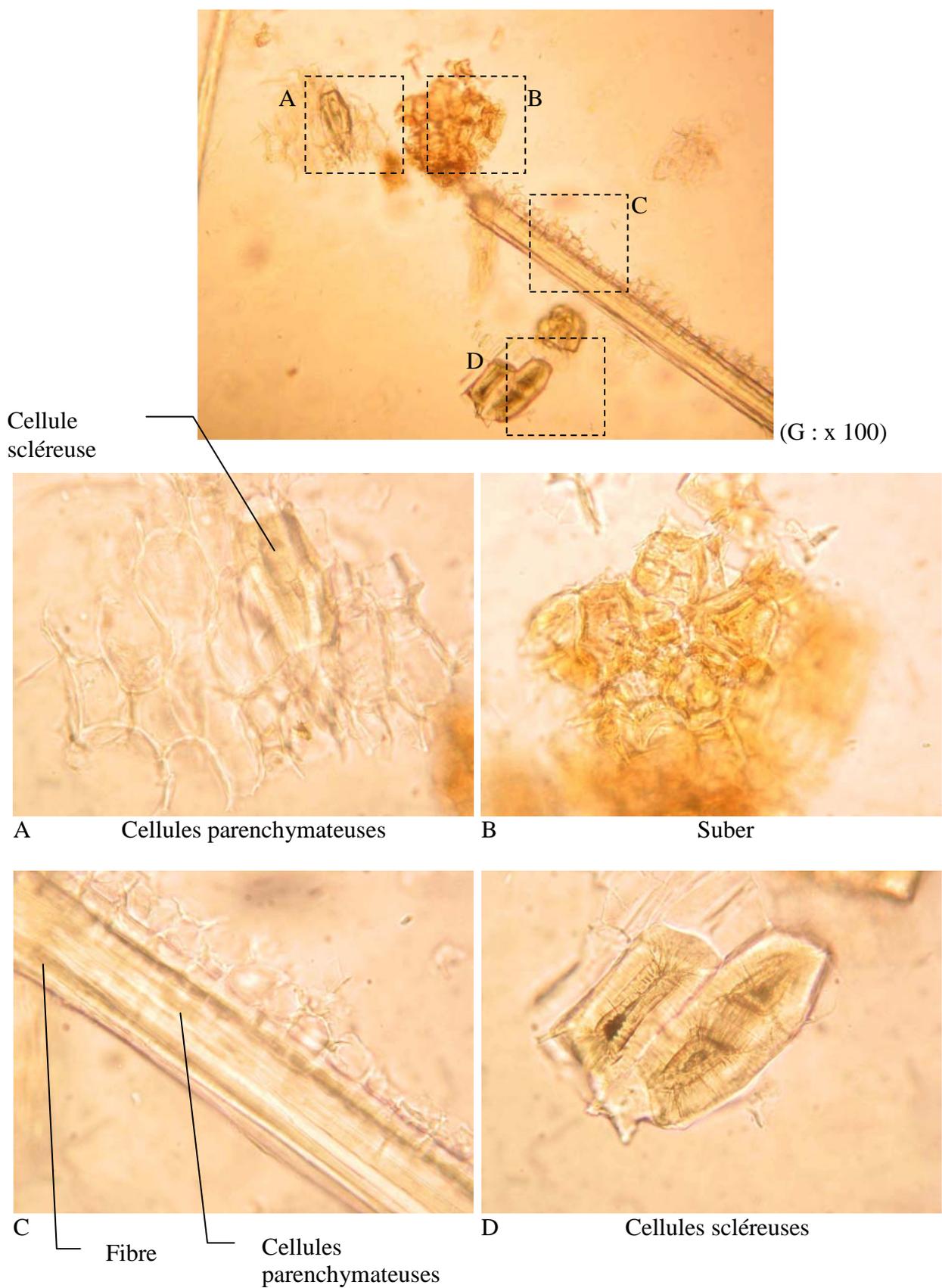
Canalicule ——— Lumen d'une cellule scléreuse

**Figure 11 : Nodule scléreux (G : x 400)**



——— Groupe de cellules du suber

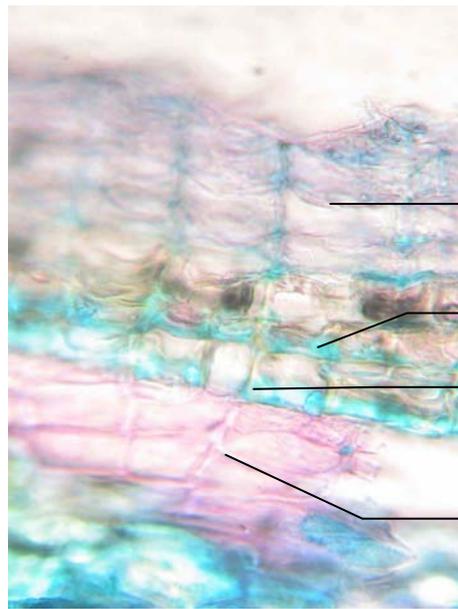
**Figure 12 : Fragment de suber (G : x 400)**



**Figure 13 : Eléments caractéristiques de la poudre d'écorce de *P. cuspidata* (G : x 400)**

## Anatomie de l'écorce (section transversale)

(G : x 100) A



Suber

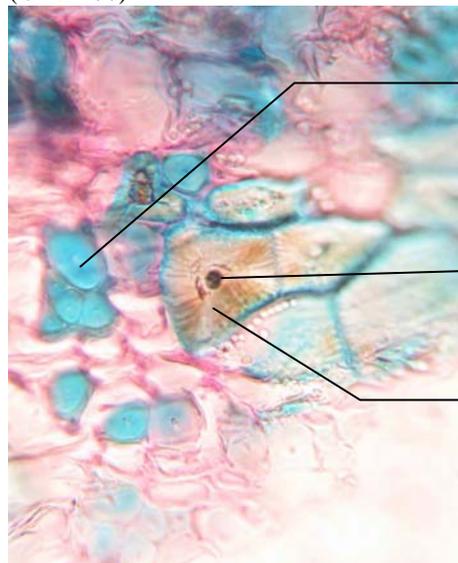
Suber dure en U

Assise  
génératrice

Phelloderme

A

(G : x 400)



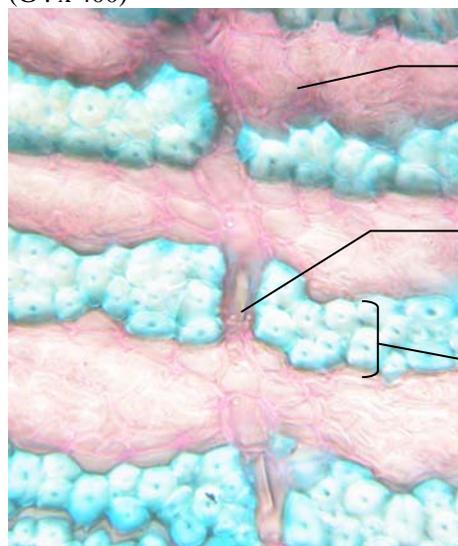
Fibres

Lumen d'une  
cellule scléreuse

Cellule scléreuse

B

(G : x 400)



Parenchyme libérien

Cristal prismatique  
d'oxalate de calcium

Amas de fibres

C

Figure 14 : Section transversale détaillée de l'écorce de *P. cuspidata*

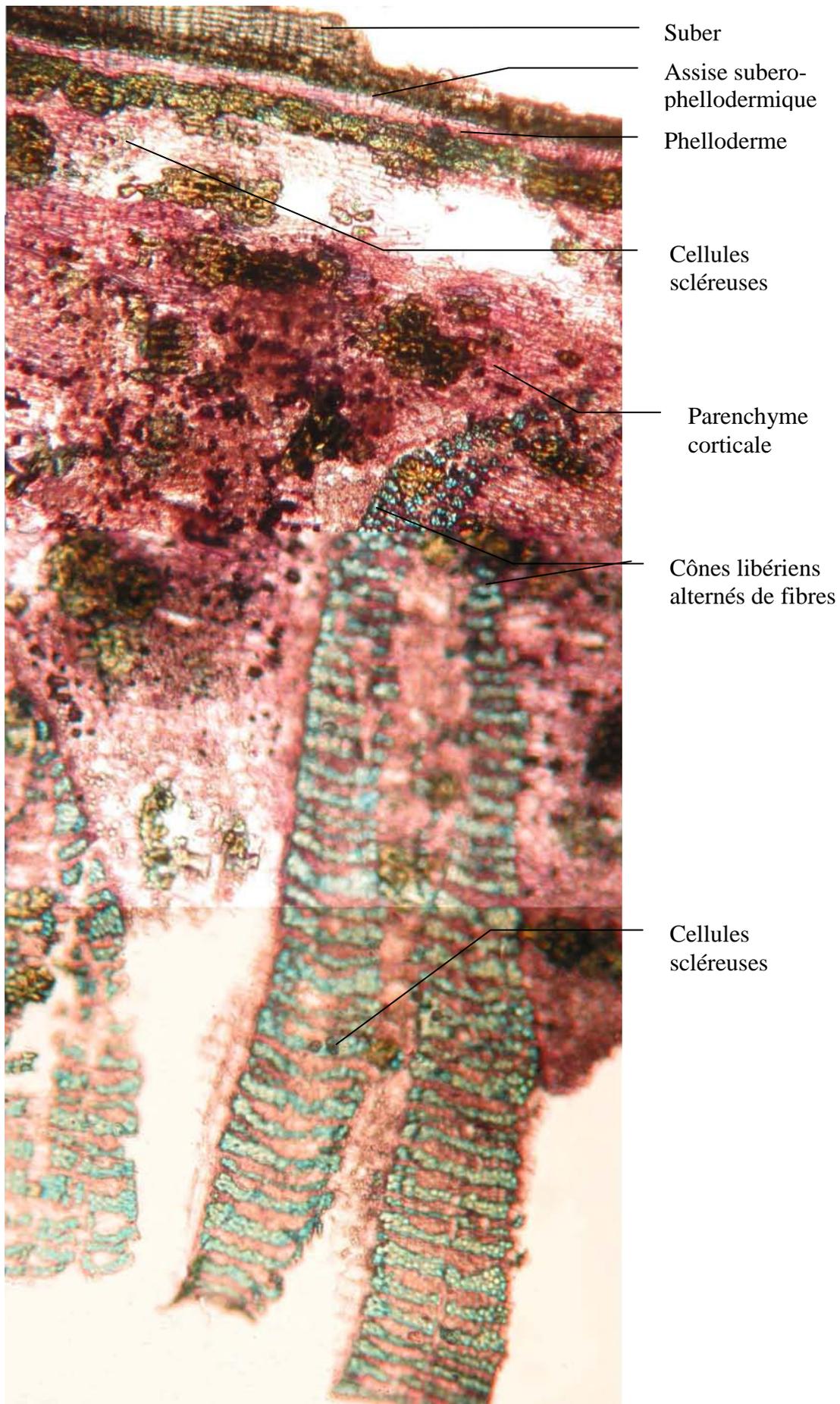


Figure 15 : Section transversale de l'écorce de *P. cuspidata* (G : x 100)

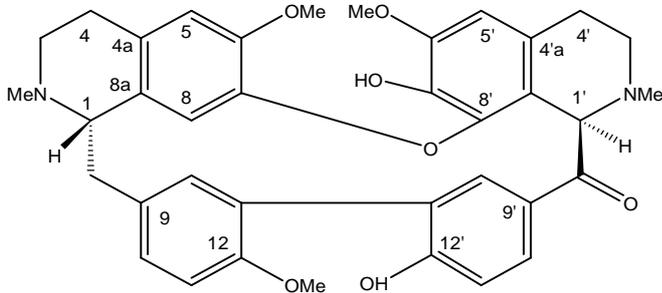
L'écorce est trempée dans l'eau pendant quelques heures puis débitée en fines lamelles placées dans une solution d'hypochlorite de sodium (10 %) puis rincées et immergées quelques minutes dans du colorant carmino vert (**X<sup>ème</sup> Pharmacopée française**) et finalement rincées. La section présente, de l'extérieur vers l'intérieur (Figure 14 et Figure 15) :

- plusieurs assises de cellules de suber alignées en file radiale
- un suber dur avec des cellules épaissies en U
- une assise génératrice subéro-phellodermique
- du phelloderme
- un péricycle
- des cônes libériens alternés de faisceaux de fibres et de cellules scléreuses.

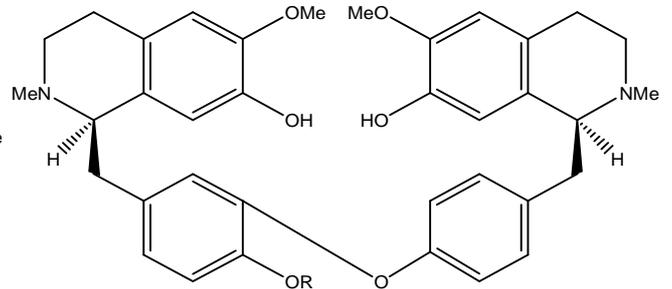
## **2. Description phytochimique du genre *Pseudoxandra***

Les données phytochimiques du genre *Pseudoxandra* ne concernent que les écorces de trois espèces : *P. Lucida* R. E. Fr., *P. sclerocarpa* Maas et *P. cuspidata* Maas, parmi les six espèces de ce genre [Cortes, 1985]. Les principaux composés qui en ont été isolés sont des alcaloïdes isoquinoléiques [Cortes, 1986a] [Cortes, 1986b].

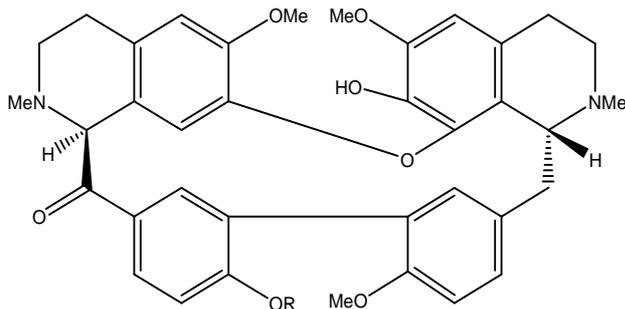
## 2.1. Les bisbenzyloquinoléines



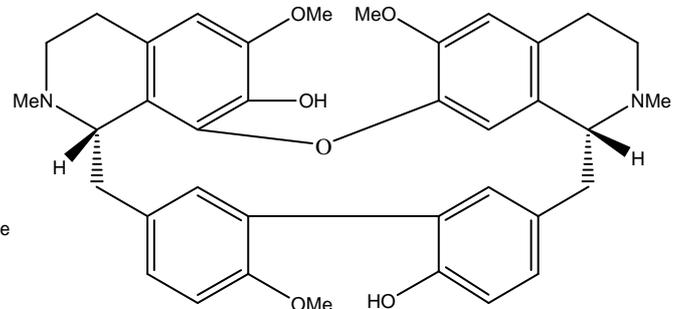
Pseudoxandrine (M = 622) *P. lucida*



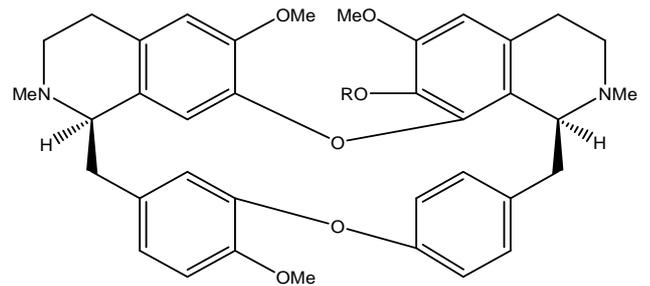
R = H : Berbamunine (M = 596) *P. sclerocarpa*  
R = Me : Thaligrisine (M = 610) *P. sclerocarpa*



R = H : Oxandrine (M = 622) *P. lucida*  
R = Me : 12' methoxy-oxandrine (M = 636) *P. lucida*

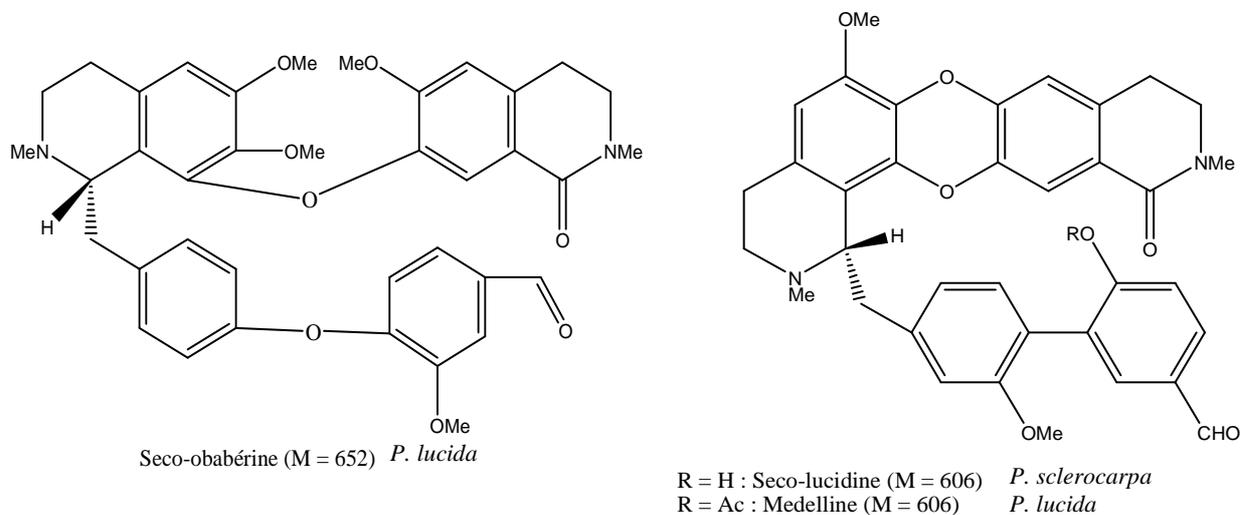


Antioquine (M = 608) *P. lucida*

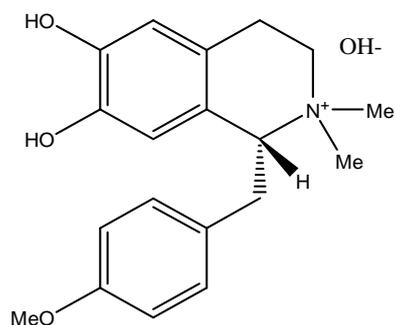


R = H : Homoaromoline (M = 608) *P. sclerocarpa*  
R = Me : Obaberine (M = 622) *P. lucida*

## 2.2. Les séco-bisbenzylisoquinoléines

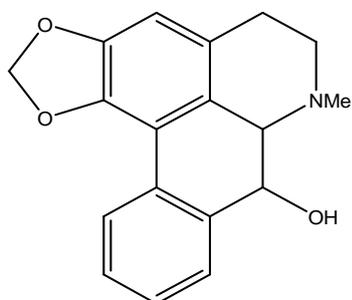


## 2.3. Les benzylisoquinoléines



Luxandrine (M = 314) *P. sclerocarpa*

## 2.4. Les aporphines



Ushinsunine (M = 295) *P. sclerocarpa*

### 3. Extractions alcaloïdiques de *Pseudoxandra cuspidata*

#### 3.1. Première série d'extraction

**Nous avons choisi de travailler les fractions alcaloïdiques en raison de leur activité antiplasmodiale (**

Figure 16). La première étape a été de broyer l'écorce (grâce à un broyeur à marteau munis d'un tamis de 0,3 mm) afin d'obtenir une poudre homogène. Cette poudre a été dégraissée par de l'éther de pétrole puis imprégnée d'ammoniaque (0,1 N). Les analyses en chromatographie sur couche mince, par révélation au réactif de Dragendorff, ont montré la présence de quelques alcaloïdes dans la phase éther de pétrole, ces derniers ont été récupérés par extraction à l'eau acidifiée (HCl : 0,1 N) puis repris en milieu alcalin dans du dichlorométhane et mis de côté. Le marc ammoniacé a été placé dans une colonne en verre puis épuisé à l'éther éthylique afin d'extraire les alcaloïdes par lixiviation. Le totum alcaloïdique obtenu (additionné des alcaloïdes récupérés dans la phase éther de pétrole précédente) a été par la suite fractionné grâce à différentes colonnes de silice. Nous avons tout d'abord réalisé un fractionnement de 6 g du totum alcaloïdique sur colonne ouverte de gel de silice élué par un gradient de phase éluante. Nous avons ainsi obtenue 6 fractions (A à F), dont une particulièrement active sur *P. falciparum* (fraction E,  $CI_{50} = 2,2 \mu\text{g/ml}$ ). A la suite de nombreux fractionnements de cette fraction (E), réalisés sur colonnes moyenne pression ou pression réduite de gel de silice, nous sommes parvenus à l'obtention des fractions A', B', C'. La purification de la fraction A' sur colonne moyenne pression de gel de silice a menée à l'obtention de la fraction A''. Cette fraction A'' (500 mg), a été purifiée par cristallisation dans un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (2/8/1). Les cristaux obtenus se présentent sous forme de fines aiguilles blanches jaunissant à l'air ambiant. Le travail réalisé sur la fraction 2 (265 mg), issue de B' par fractionnement sur colonne de gel de silice, nous a permis de mettre au point une série de protocoles à la fois préparatifs et analytiques détaillés dans la partie "matériel et méthodes". Concernant le support en gel de silice, différentes techniques chromatographiques ont été testées telles que le chromatotron® (chromatographie circulaire centrifuge), les colonnes ouvertes, les cartouches sous pression réduite (SPE), les colonnes moyennes pression et la chromatographie sur couche mince. L'utilisation de silice traitée à l'acétate de sodium nous a permis d'optimiser la résolution des séparations par rapport à un gel de silice normale (ou bien même traité à la soude ou à l'acétate d'ammonium qui, par ailleurs, oxydent l'aluminium des plaques CCM). La phase éluante optimisée pour ce support particulier est un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{DEA}$  (diéthylamine). D'autres supports ont été testés tels que le polyamide ou la silice greffée en  $\text{C}_{18}$ , mais avec des résultats peu probants.

Concernant les techniques CLHP, un protocole a également été adapté au type de composés travaillés. Il s'agit d'utiliser une colonne de silice greffée en C<sub>18</sub> avec une phase éluante tamponnée à pH = 9,5 (HCO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> + NH<sub>4</sub>OH), H<sub>2</sub>O/MeCN.

La première série d'extraction a mené à l'isolement et à la purification d'un composé acide contre *P. falciparum* (issu de la fraction A''), ainsi qu'à l'optimisation d'un protocole de purification. Par ailleurs, deux fractions de 4 mg chacune, insuffisamment pures et de masse molaire très importante (> 600 g/mol) n'ont pu être identifiées en raison de leur trop faible quantité. Une seconde série d'extractions à partir de plus grandes quantités de drogue végétale et avec des protocoles de séparation affinés a alors été réalisée (le bioguidage a été effectué avec l'hypoxanthine tritiée, sur souche de *P. falciparum* : FcB1).

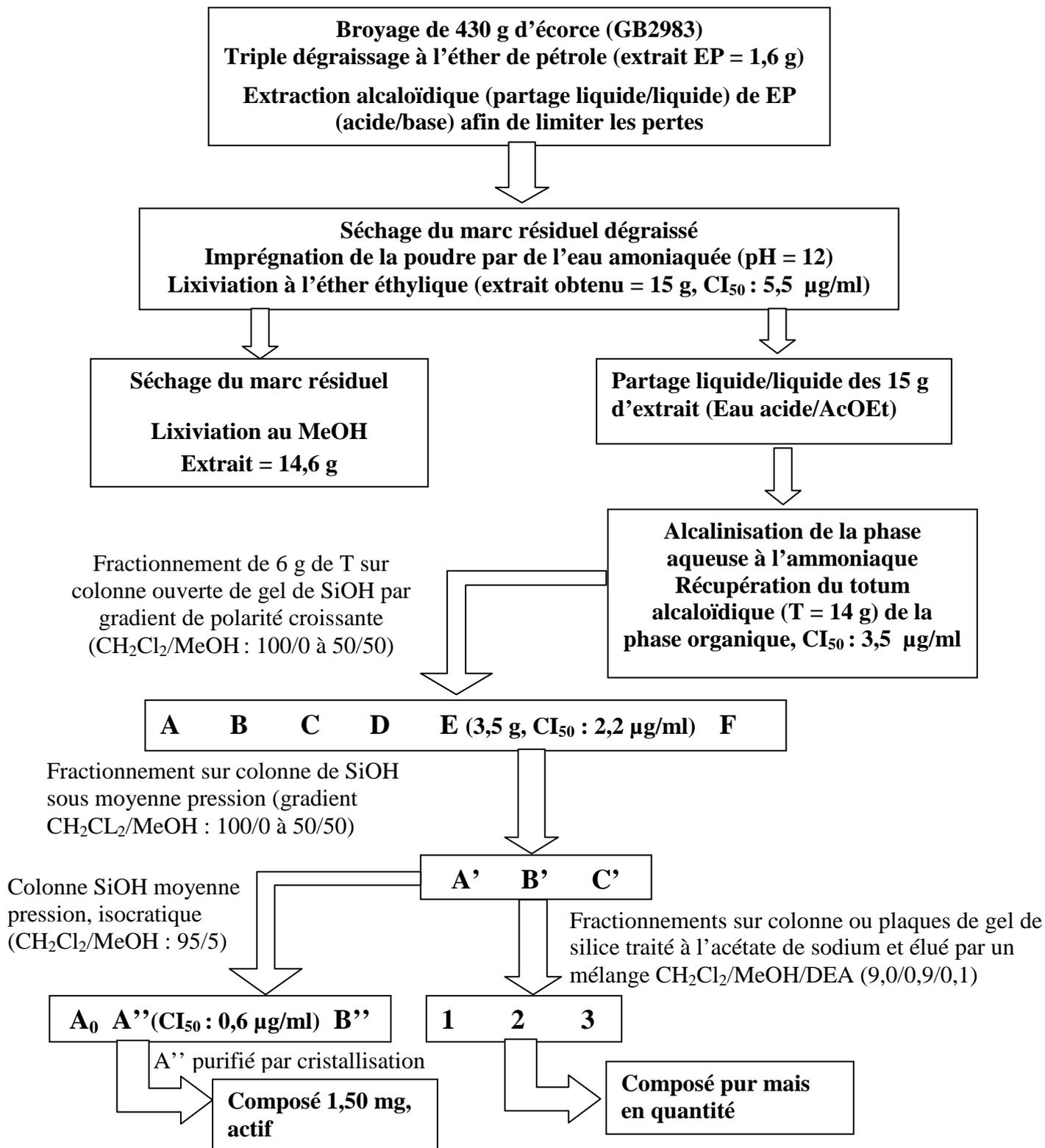
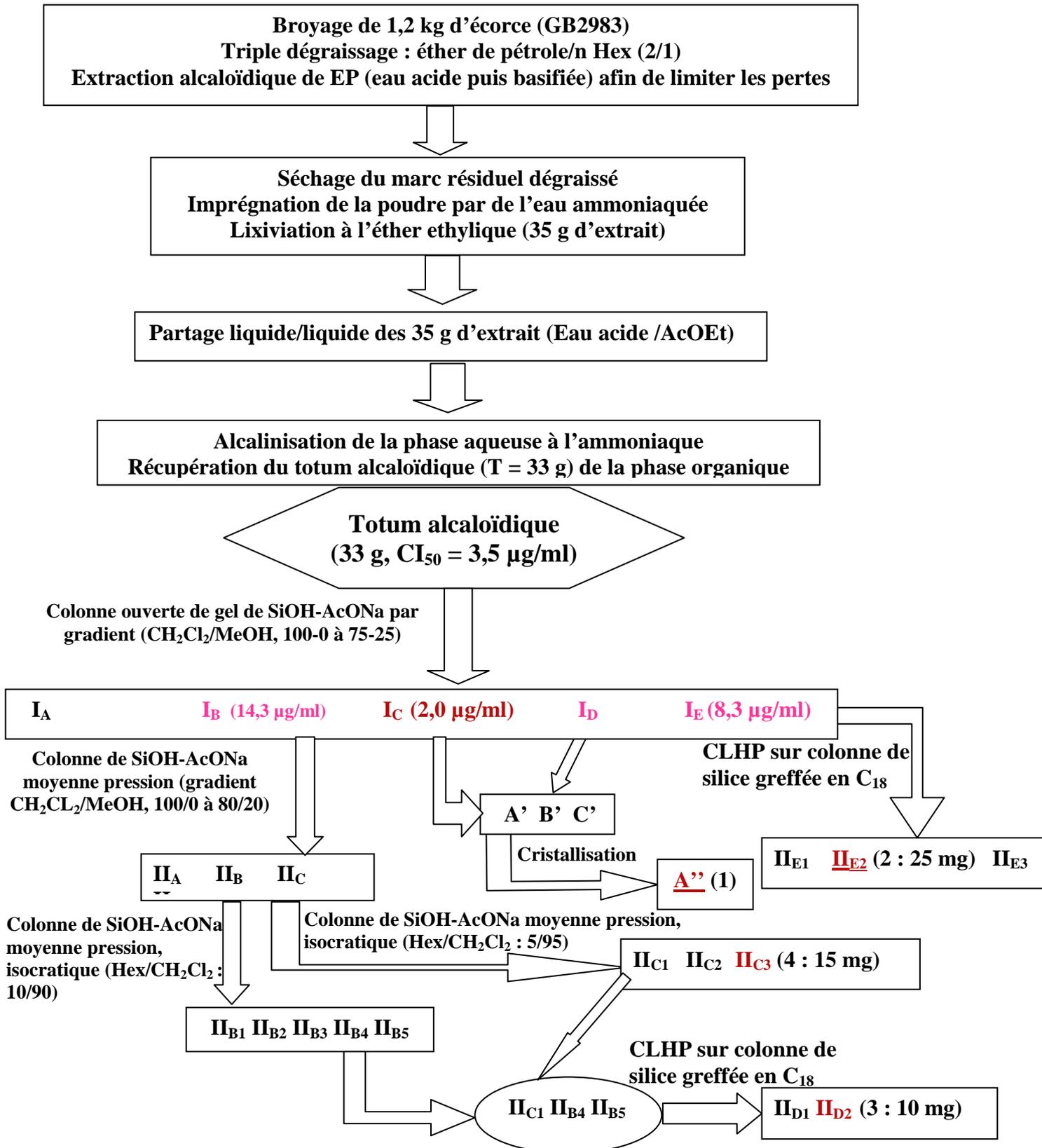


Figure 16 : Schéma simplifié de la première série d'extraction réalisée sur *P. cuspidata*

### 3.2. Deuxième série d'extraction

Le travail effectué lors de cette deuxième série d'extraction (Figure 17) est très similaire à celui décrit précédemment, mais réalisé sur une plus grande quantité de drogue. De plus, les colonnes de silice normale ont été remplacées par des colonnes de silice traitée à l'acétate de sodium (afin d'optimiser la résolution des séparations). Cette technique a tout d'abord permis la séparation de 5 fractions ( $I_A$  à  $I_E$ ) dont trois différentes caractérisées par des activités antiplasmodiales ( $I_B$ ,  $IC_{50} = 14,3 \mu\text{g/ml}$  ;  $I_C$ ,  $IC_{50} = 2,0 \mu\text{g/ml}$ , renfermant le composé **1** déjà isolé lors de la première série d'extraction ; et  $I_D$ ,  $IC_{50} = 8,3 \mu\text{g/ml}$ ). Chacune de ces trois fractions ont été purifiées sur colonne de gel de silice traitée à l'acétate de sodium, puis par chromatographie liquide haute performance sur silice greffée en  $C_{18}$ . Nous avons ainsi obtenus les fractions  $II_{C3}$  (composé **4**),  $II_{D2}$  (composé **3**) et  $II_{E2}$  (composé **2**) qui sont trois fractions dont les polarités sont inférieures (pour  $II_{C3}$  et  $II_{D2}$ ) ou supérieure (pour  $II_{E2}$ ) à celle du produit cristallisé, issu de la première extraction ( $A''$ : composé **1**). Ces trois nouvelles fractions ont été purifiées par CLHP en milieu tamponné (pH : 9,5 ;  $H_2O/MeCN$ ) pour  $II_{D2}$  et  $II_{E2}$  (25/75 et 58/42) ou sans tampon pour  $II_{C3}$  ( $H_2O/MeCN$ , 30/70). Un des composés isolés a nécessité des précautions de conservation particulières (sous argon, en chambre froide) car les analyses RMN ont prouvé qu'il se dégradait (à l'air libre ou dans le chloroforme deutéré).



**Figure 17 : Schéma simplifié de la deuxième série d'extraction réalisée sur *P. cuspidata***

Les concentrations inhibitrices (CI<sub>50</sub>) données ont été mesurées sur des souches de *P. falciparum* FcB1 chloroquino-résistantes et par détection à l'hypoxanthine tritiée (détaillé dans la partie expérimentale).

## 4. Identification des composés isolés de *Pseudoxandra cuspidata*

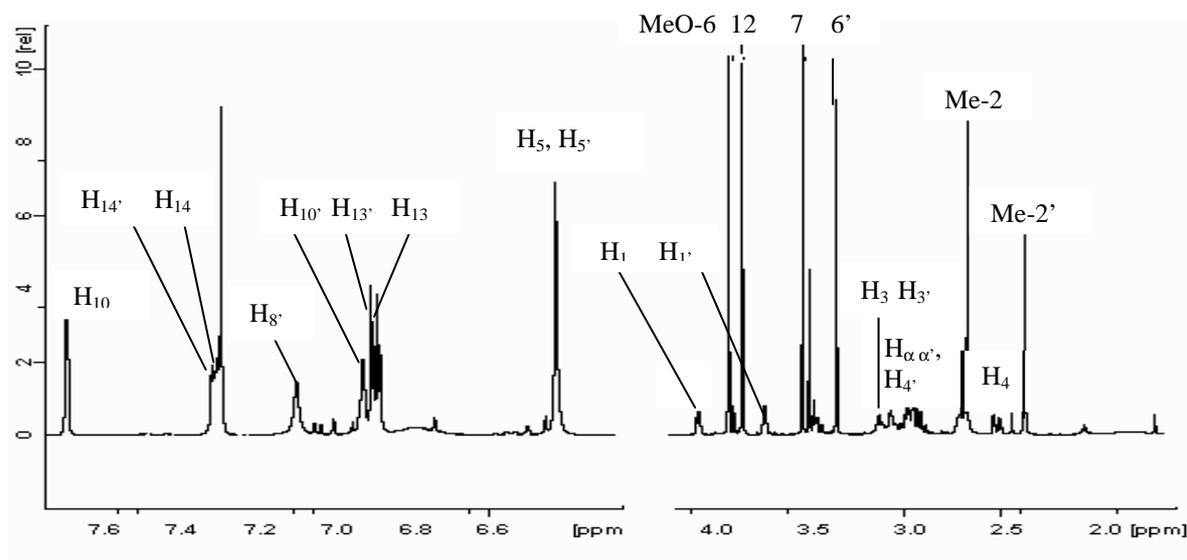
Le fractionnement bioguidé de l'écorce de *P. cuspidata* a orienté les recherches vers l'isolement de quatre alcaloïdes appartenant à différentes familles (bisbenzylisoquinoléine, seco-bisbenzylisoquinoléine, aza-anthracène et oxo-aporphine), dont un majoritaire particulièrement actif sur *P. falciparum*, le composé 1.

### 4.1. Identification du composé 1 (A'')

Le premier composé isolé du totum alcaloïdique, sous forme de cristaux blancs en aiguilles, est le plus abondant des alcaloïdes (environ 10 % du totum). Les analyses en spectrométrie de masse haute résolution de type HR-ESI-MS révèlent un ion quasi-moléculaire  $m/z = 623,3129$  ( $M + H^+$ ) permettant de déduire la formule brute  $M + H^+ : C_{38}H_{43}N_2O_6$  (1,3 ppm). La présence de deux atomes d'azote dans la molécule (pour une masse moléculaire  $M$  paire) est confirmée par la révélation de ce composé au réactif de Dragendorff (réactif quasi-spécifique des alcaloïdes). Son pouvoir rotatoire est  $[\alpha]^{25}_D = +74^\circ$  (c 1,7,  $CHCl_3$ ). Le spectre UV, réalisé dans le méthanol, indique des maxima d'absorption à  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) : 204 (4,5), 212 (4,2), 233 (4,1) (cycles aromatiques), 284 (4,1) (phénol substitué). Nous observons un effet hyperchrome lors du passage en milieu alcalin (NaOH : 0,01 N), en relation avec la présence de structures phénoliques.

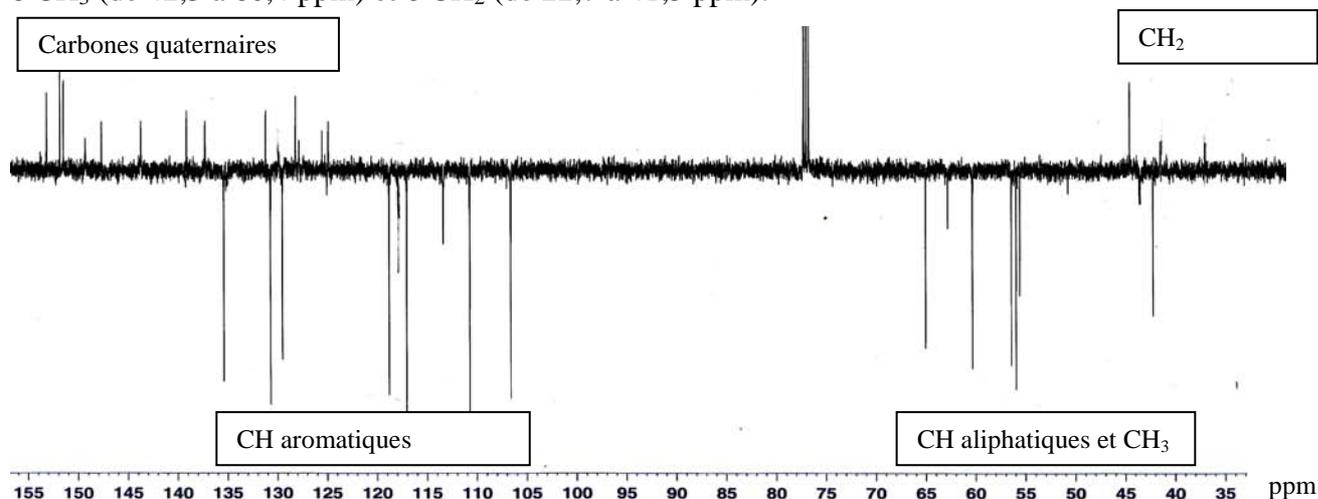
Le spectre de RMN- $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ) présente trois grandes zones d'intérêt (Figure 18) :

- La première, concerne 9 protons aromatiques disposés d'une part en deux systèmes de spin de trois protons (de 6,85 à 7,65 ppm) dont deux systèmes de deux protons vicinaux avec une constante de couplage  $J_{vic} = 8,1$  Hz et deux protons en position meta  $J_{meta} = 2,1$  Hz; et, d'autre part en trois protons aromatiques isolés ( $\delta_H$ : 7,07, et 6,40, 2 H) (Figure 18).
- La seconde, la zone centrale du spectre, est caractérisée par la présence de quatre groupements méthoxy ( $\delta_H$ : 3,32, 3,50, 3,83 et 3,90 ppm (4 x 3H, s)) et de deux C-H ( $\delta_H$ : 4,03 ppm,  $H_1$  et  $\delta_H$ : 3,69 ppm,  $H_1$ ).
- Enfin, la dernière zone du spectre, celle de champ élevé, comporte deux systèmes de quatre protons aliphatiques (de 2,49 à 3,47 ppm) portés par des carbones vicinaux, et deux autres  $CH_2$ , dont les signaux superposés ne permettent pas d'évaluer les constantes de couplage. Cette zone comporte également deux singulets intégrant chacun pour trois protons (N-Me,  $\delta_H$ : 2,35 et 2,65 ppm, caractérisant deux groupements N-Me) (Figure 18).



**Figure 18 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé (1)**

L'analyse du spectre RMN-<sup>13</sup>C (*J-mod*) (Figure 19) met en évidence l'existence de 38 carbones dont les déplacements chimiques et la position des signaux par rapport à la ligne de base permettent de différencier 15 carbones quaternaires (de 124,9 à 153,2 ppm), 9 CH aromatiques (de 106,6 à 135,4 ppm), 2 CH aliphatiques ( $\delta_C$  : 62,8 et 65,1 ppm : CH<sub>1</sub> et CH<sub>1</sub>'), 6 CH<sub>3</sub> (de 42,3 à 60,4 ppm) et 6 CH<sub>2</sub> (de 22,7 à 41,5 ppm).



**Figure 19 : RMN-<sup>13</sup>C (*J-mod*), (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé (1)**

Les corrélations observées sur le spectre de RMN 2D HSQC du composé **1** nous indiquent les déplacements chimiques des différents protons liés à ces carbones (Tableau 5 p. 80). Concernant les 6 groupements CH<sub>3</sub>, l'analyse des corrélations figurant sur le spectre RMN 2D HSQC, nous permet de préciser la présence de quatre groupements méthoxy ( $\delta_H$  : 3,32, 3,50, 3,80 et 3,83 ppm sous forme de singulets intégrant chacun pour trois protons) avec les déplacements chimiques de leurs carbones respectifs ( $\delta_C$  : 55,6, 60,4, 56,4 et 56,0 ppm) et de deux groupements N-Me (toujours sous forme de singulets intégrant chacun pour trois

protons mais de déplacements chimiques plus faibles,  $\delta_H$  : 2,35 et 2,65 ppm corrélant aux carbones  $CH_3$  :  $\delta_C$  : 42,3 et 44,5 ppm). Concernant les six groupements  $CH_2$ , les corrélations observées sur le spectre HMBC prouvent d'une part que 2 d'entre eux ( $H_{2\alpha}$  et  $H_{2\alpha'}$ ,  $\delta_H$  : 2,88 à 2,92 et 2,97 à 3,09 ppm) sont liés à un cycle aromatique et à un carbone tertiaire ( $CH_1$  ou  $CH_{1'}$  :  $\delta_C$  : 62,8 et 65,1 ppm) lui même corrélant avec un des deux groupements N-Me ( $\delta_H$  : 2,35 et 2,65 ppm), et, d'autre part, que les quatre autres  $CH_2$  forment deux groupes  $CH_2-CH_2$  indépendants, chacun à proximité d'un cycle aromatique différent.

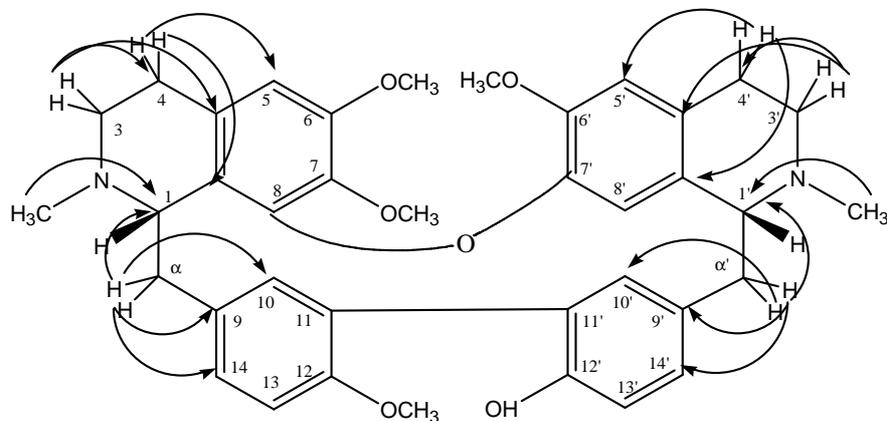
La formule brute (indiquée par la spectrométrie de masse haute résolution :  $C_{38}H_{43}N_2O_6$ ), la disposition et la multiplicité des signaux observés en RMN, ainsi que la comparaison avec les données bibliographiques, permettent d'identifier un squelette de type bisbenzylisoquinoléine.

Etant donné le nombre de carbones quaternaires (15) et le nombre de groupements méthoxy (4), tout en considérant la présence d'une fonction phénolique (observée en UV) pour la formule brute  $C_{38}H_{43}N_2O_6$  d'une bisbenzylisoquinoléine, il apparaît que les deux parties benzylisoquinoléines de la molécule sont liées par deux ponts, l'un carbone-carbone, l'autre de type éther (C-O-C).

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage des protons des parties bisbenzyls de la molécule montrent deux systèmes semblables. Chacun est constitué : de deux protons vicinaux ( $H_{13}-H_{14}$ ,  $\delta_H$  : 6,87 et 7,27 ppm ; ou  $H_{13'}-H_{14'}$ ,  $\delta_H$  : 6,85 et 7,28 ppm avec des constantes de couplages  $J_{13-14} = J_{13'-14'} = 8,1$  Hz) et d'un proton isolé ( $H_{10}$ , ou  $H_{10'}$ ,  $\delta_H$  : 6,90 ou 7,65 ppm sous forme de doublets,  $J_{10-14} = J_{10'-14'} = J_{meta} = 2,1$  Hz). Les différentes corrélations HMBC de ces protons aromatiques avec les carbones quaternaires aromatiques ( $C_{11}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{11'}$  et  $C_{12'}$ ,  $\delta_C$  : 137,3, 153,2, 117,9 et 151,8 ppm) ainsi que les corrélations de ces mêmes protons avec les  $CH_{2\alpha}$  et  $CH_{2\alpha'}$  ont permis la mise en évidence de la jonction de cycle  $C_{11}-C_{11'}$  ainsi que la présence d'une fonction OH sur  $C_{12'}$  (de déplacement chimique caractéristique  $\delta_C$  : 151,8 ppm) et d'un méthoxy ( $\delta_C$  : 56,4 et  $\delta_H$  : 3,80 ppm) sur  $C_{12}$  ( $\delta_C$  : 153,2 ppm).

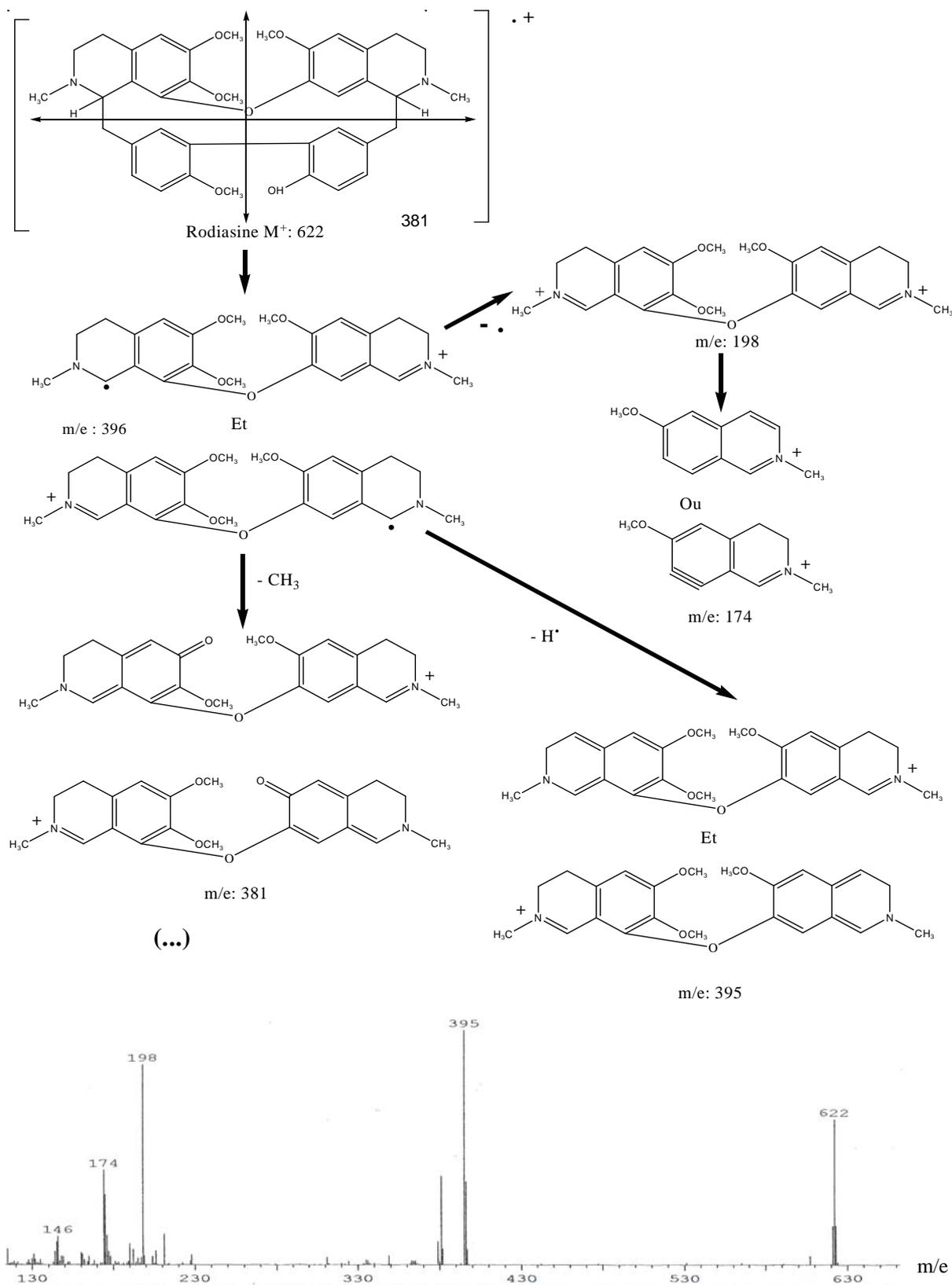
Enfin, concernant les deux parties isoquinoléines du composé **1**, nous avons décrit précédemment pour chacune d'elles l'existence d'un système  $CH_2-CH_2$  à proximité d'un cycle aromatique d'une part, et d'un groupement N-Me d'autre part. Les deux cycles aromatiques des deux parties isoquinoléines de la molécule se différencient par l'existence de deux protons aromatiques isolés dans un cas ( $H_{5'}$  et  $H_{8'}$  : singulets larges à 6,40 et 7,07 ppm) alors qu'un seul proton aromatique est présent dans l'autre partie isoquinoléine ( $H_5$  : 6,40 ppm). Les corrélations HMBC de ces différents protons avec des carbones quaternaires telles que  $H_{8'}$  avec  $C_{1'}$  et  $C_{6'}$  ou  $H_{5'}$  avec  $C_{7'}$  et  $C_{4'}$ , ainsi que  $H_5$  avec  $C_7$  et  $C_4$  en  $J^3$  permettent de

localiser les trois substituants méthoxy (sur  $C_6$  : 151,5 ppm,  $C_6'$  : 147,7 ppm et  $C_7$  : 139,1 ppm) ainsi que de préciser la liaison entre les deux unités isoquinoléines  $C_8$ -O- $C_7'$  (Figure 20).



**Figure 20 : Corrélations observées sur le spectre HMBC (500MHz,  $CDCl_3$ ) du composé 1**

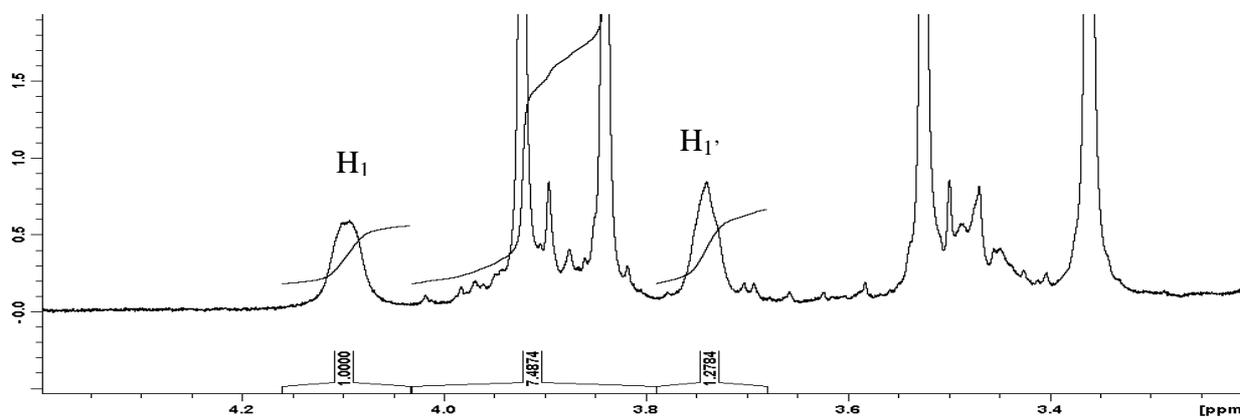
La comparaison de ces caractères structuraux avec les données bibliographiques concernant les bisbenzylisoquinoléines déjà isolées dans la famille des Annonaceae ont mené l'identification du composé **1** à la rodiasine. Cette hypothèse est vérifiée par l'interprétation du spectre de masse réalisé en impact électronique (Figure 21).



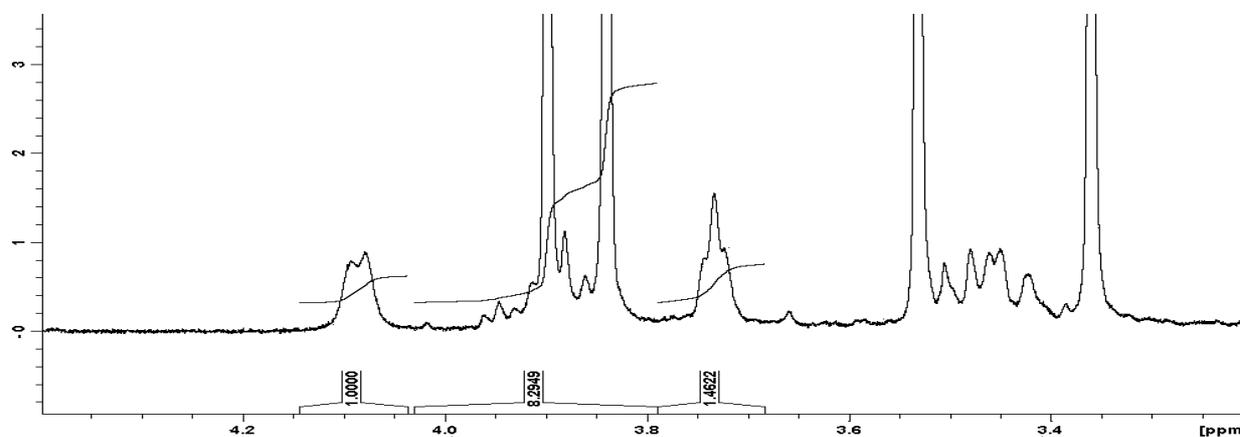
**Figure 21 : Spectre et exemples de fragmentations en masse (impact électronique) de la rodiasine [Mollov, 1971, Shamma, 1972]**

A température ambiante, la faible résolution des signaux figurant sur les spectres ne permet pas la lecture des constantes de couplage nécessaires à la détermination de la configuration du composé **1**, ce phénomène est dû à la présence de conformères.

Les corrélations observées sur les spectres de RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY vérifient la présence de ces conformères par rotation des liaisons simples entre la partie bisbenzyl et les parties isoquinoléines. Afin de favoriser un conformère par rapport à l'autre, les analyses RMN ont été réalisées à des températures plus élevées (318 K) permettant une amélioration de la résolution des spectres et ainsi de déterminer les constantes de couplage au niveau des centres asymétriques ( $\text{CH}_1$  et  $\text{CH}_1'$ ) (Figure 22 et Figure 23).



**Figure 22 : Spectre RMN- $^1\text{H}$  de la rodiasine à 273 K (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**



**Figure 23 : Spectre RMN- $^1\text{H}$  de la rodiasine à 318 K (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

Les corrélations dans l'espace (NOESY) de  $\text{H}_{\text{Ox}}$  avec  $\text{H}_{14}$  et  $\text{H}_{\text{Or}}$  avec  $\text{H}_{10}$  permettent de préciser et de distinguer les déplacements chimiques de  $\text{H}_{\text{Ox}}$  ( $\delta_{\text{H}}$  : 2,88 ppm) et  $\text{H}_{\text{Or}}$  ( $\delta_{\text{H}}$  : 2,92 ppm). L'observation des signaux de corrélation de ces deux  $\text{H}_{\alpha}$  sur le spectre  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY fournit les constantes de couplage vicinales entre  $\text{H}_{\text{Or}}$  et  $\text{H}_1$  ( $J_{\text{Ox-1}} = 8 \text{ Hz}$  ;  $J_{\text{Or-1}} < 1 \text{ Hz}$  et  $J_{\text{gem}} : 14 \text{ Hz}$ ). Ces constantes confirment d'une part la position de ces protons par rapport à  $\text{H}_1$  (par la loi de Karplus [**Haasnoot, 1980**]) mais surtout, par comparaison avec les

données bibliographiques [Jossang, 1996], ces valeurs indiquent la configuration *S* du carbone asymétrique C<sub>1</sub> (Figure 24).

La détermination de la configuration absolue de C<sub>1</sub> est plus simple puisque H<sub>1'</sub> se présente sous forme d'un triplet de constantes  $J_{\alpha's-1'} = J_{\alpha'r-1'} = 4$  Hz. Or, la littérature mentionne ces valeurs de constante de couplage dans le cas de la configuration *R* du carbone C<sub>1</sub> [Jossang, 1996]. Le composé **1** est donc la 1*S*, 1'*R* rodiasine. Cette configuration est par ailleurs partiellement confirmée par le signe négatif du pouvoir rotatoire correspondant aux énantiomères *SR* ou *RS*.

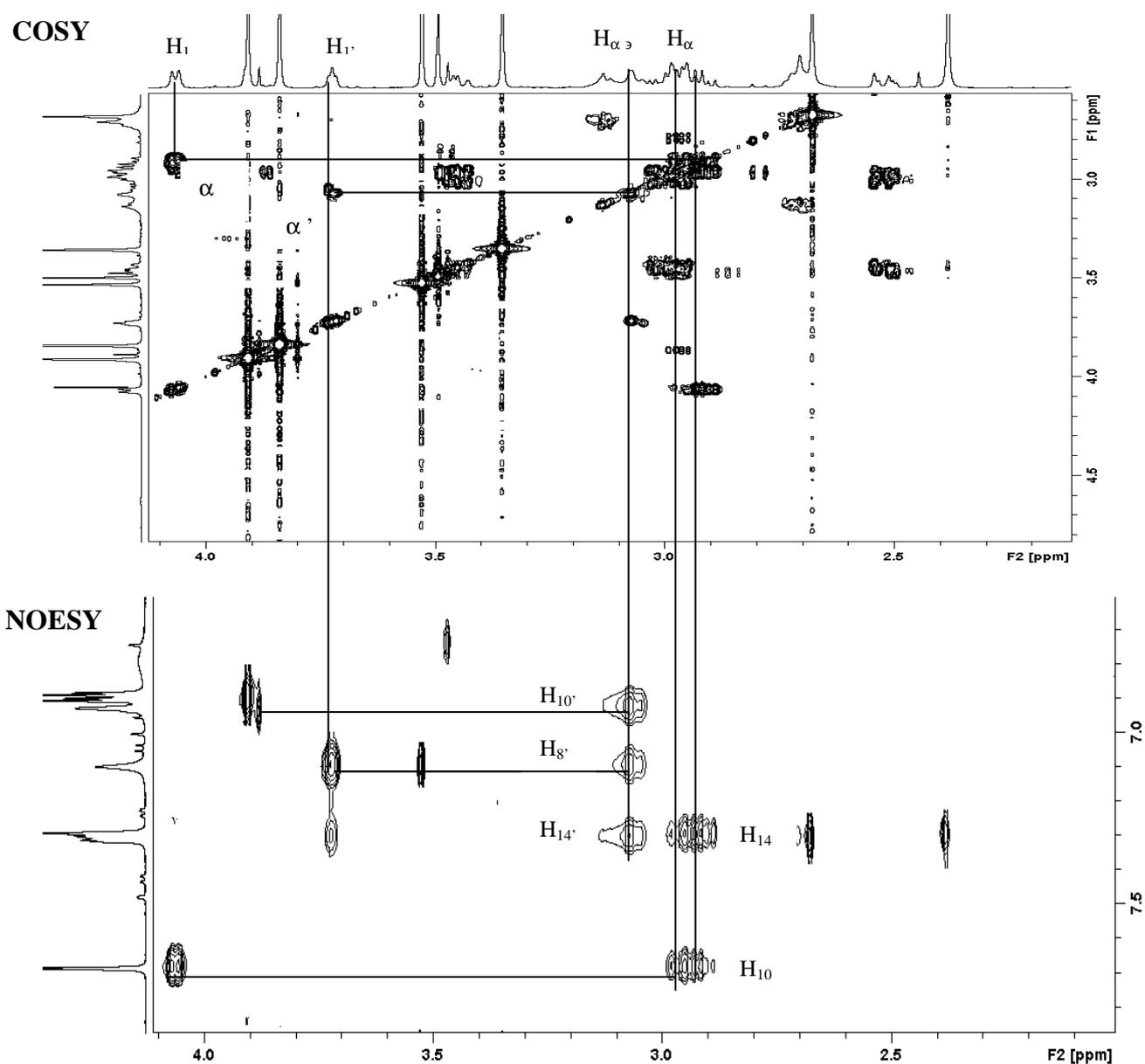
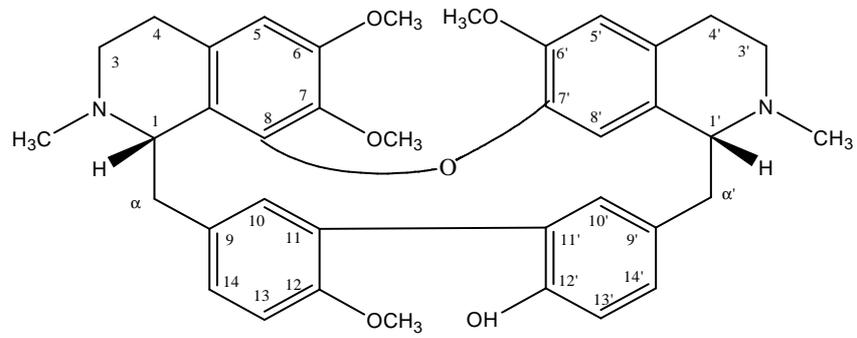


Figure 24 : Spectres 2D COSY et NOESY de la rodiasine (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**1*S*, 1'*R* rodiasine**

## 4.2. Identification du composé 2 (IIE<sub>2</sub>)

Ce composé, plus difficilement cristallisable, se présente sous forme d'une poudre brune. Les analyses en spectrométrie de masse haute résolution de type HR-ESI-MS révèlent un ion quasi-moléculaire de  $m/z = 607,2444$  ( $M + H^+$ ) supposant une formule brute :  $C_{36}H_{35}N_2O_7$  (8,3 ppm). De même que pour le composé 1, l'hypothèse de deux atomes d'azote impliqués dans cette formule brute (de masse moléculaire  $M$  paire) est confirmée par la réaction positive de ce composé au réactif de Dragendorff. Cette molécule possède un pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{25} = -20^\circ$  (c 0,9,  $CHCl_3$ ), et un spectre UV ( $CHCl_3$ ) présentant des maxima d'absorption aux longueurs d'ondes :  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) : 233 (4,5) (cycles benzéniques), 253 (4,4) (méthoxy-benzaldéhyde), 275 (4,2), 316 (3,9) (aromatiques méthoxylés...). Le spectre infra-rouge  $IR^{KBr}$   $_{max} cm^{-1}$  : 2924, 2852, 1686, 1648 indique la présence d'une fonction carbonyle ( $1686 cm^{-1}$ ) et d'une fonction lactame ( $1648$  et  $2924 cm^{-1}$ ).

Le spectre de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz,  $CDCl_3$ ) comporte deux parties :

- la zone des signaux aromatiques comprenant : un proton aldéhydique de déplacement caractéristique ( $\delta_H$  : 9,80 ppm), 1 système de quatre protons couplant ensemble deux à deux ( $\delta_H$  : 6,90 et 7,22 ppm : 2 x 2H ;  $J_{vic} = 8,6$  Hz), un système de deux autres protons vicinaux ( $\delta_H$  : 7,09 et 7,64 ppm ;  $J_{vic} = 8,5$  Hz) et quatre autres protons aromatiques isolés ( $\delta_H$  : 6,31 ; 6,76 ; 7,39 et 7,58 ppm).

- La zone des signaux aliphatiques comportant : deux singulets correspondant à deux groupements méthoxy ( $\delta_H$  : 3,86 et 3,96 ppm : 2 x 3H), deux singulets correspondant à des fonctions N-Me de déplacement chimique plus faible ( $\delta_H$  : 2,39 et 3,12 ppm : 2 x 3H), un C-H ( $\delta_H$  : 3,95 ppm), deux systèmes de quatre protons aliphatiques voisins deux à deux et un  $CH_2$  isolé ( $\delta_H$  : 2,28 à 3,53 ppm).

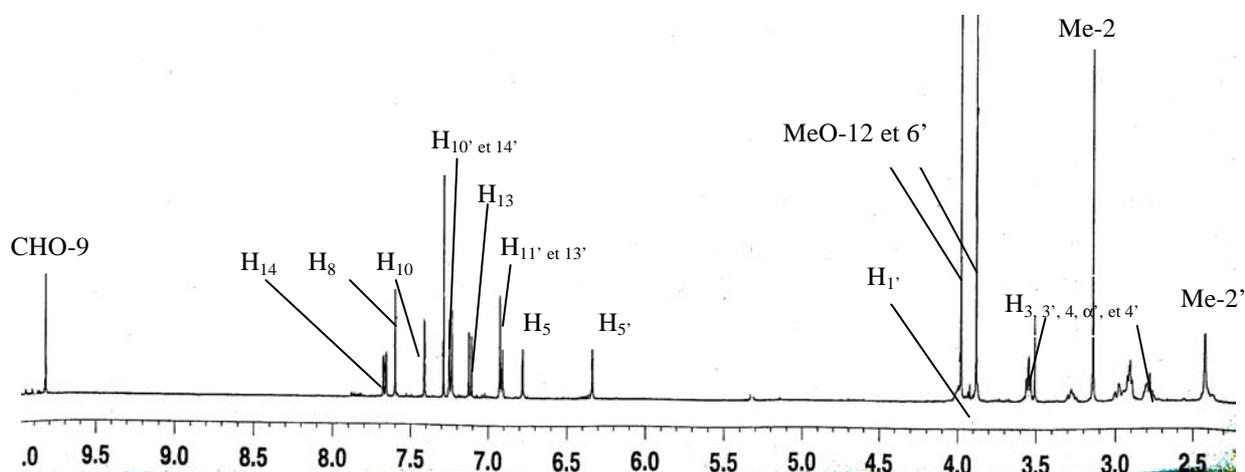
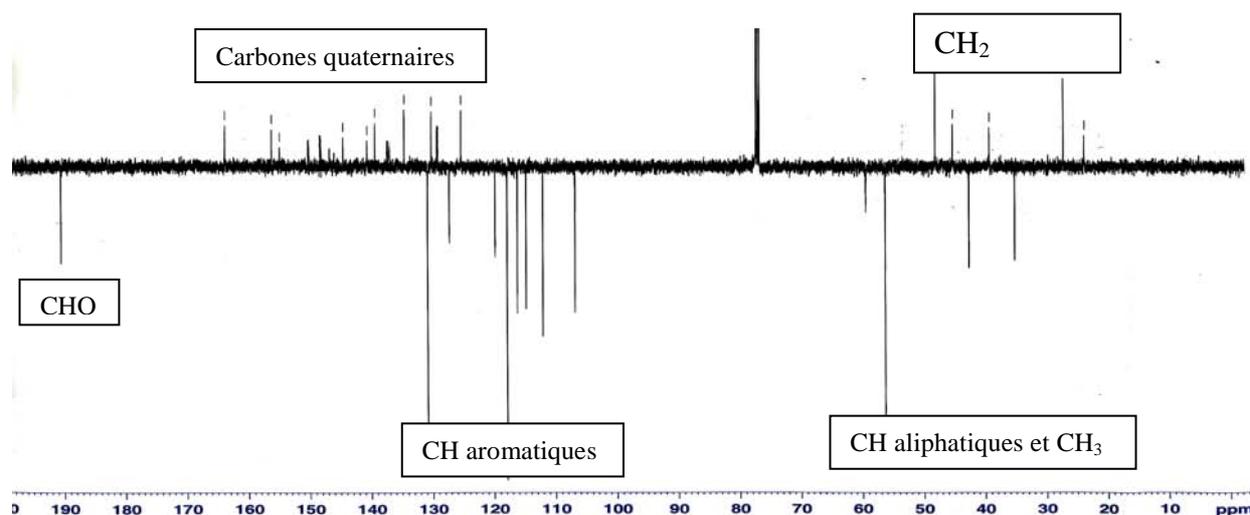


Figure 25 : 1 D RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz,  $CDCl_3$ ) du composé 2

ppm

L'analyse du spectre RMN-<sup>13</sup>C (*J-mod*) met en évidence l'existence de 36 carbones dont les déplacements chimiques et la position des signaux par rapport à la ligne de base permettent de différencier 16 carbones quaternaires (de 112,0 à 190,5 ppm), 10 CH aromatiques (de 106,8 à 130,8 ppm), 1 CH aliphatique ( $\delta_C$  : 3,93 ppm : CH<sub>1'</sub>), 4 CH<sub>3</sub> (de 35,2 à 59,4 ppm) et 5 CH<sub>2</sub> (de 23,8 à 56,3 ppm). Parmi les carbones quaternaires, deux possèdent des déplacements chimiques caractéristiques d'une fonction lactame ( $\delta_{C1}$  : 163,8 ppm) et d'une fonction aldéhydique ( $\delta_{CHO-9}$  : 190,5 ppm).



**Figure 26 : RMN-<sup>13</sup>C (*J-mod*), (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé 2**

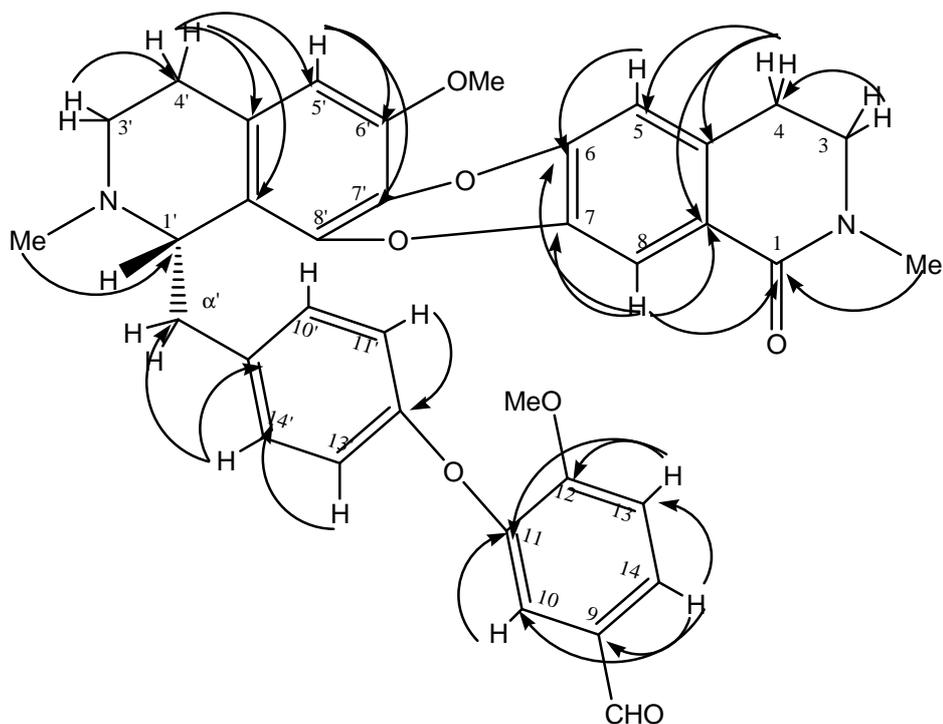
Les corrélations figurant sur le spectre HSQC des quatre groupements CH<sub>3</sub> permettent de distinguer deux groupements méthoxy (singulets à  $\delta_H$  : 3,86 et 3,96 ppm et  $\delta_C$  : 56,3 et 59,4 ppm) ainsi que deux fonctions N-Me de déplacements chimiques plus faibles (singulets à  $\delta_H$  : 2,39 et 3,12 ppm). Le spectre HSQC permet également l'attribution de chaque proton (aliphatique et aromatique) à chacun des carbones qui les portent, ainsi que de connaître les déplacements chimiques de la fonction aldéhydique ( $\delta_H$  : 9,80,  $\delta_C$  : 190,5 ppm).

La formule brute (supposée par spectrométrie de masse haute résolution : C<sub>38</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>), la disposition et la multiplicité des signaux observés en RMN, ainsi que la présence de certains groupements fonctionnels tels que 2 N-Me, témoignent des nombreuses similitudes structurales avec la bisbenzylisoquinoléine **1** vue précédemment. Néanmoins, la mise en évidence de fonctions particulières comme une lactame et un aldéhyde, résiduelles de l'ouverture de ce type de macrocycles [Shamma, 1972], oriente vers l'hypothèse d'une structure de la famille des séco-bisbenzylisoquinoléines [Kunitomo, 1985].

La suite de l'analyse structurale est basée sur l'observation des corrélations présentes sur le spectre HMBC (Figure 27). Le proton aldéhydique ( $\delta_{\text{H}}$ : 9,80 ppm) décrit précédemment corrèle avec quatre carbones aromatiques dont deux CH vicinaux  $\text{C}_{13}$ : 116,2 ppm ( $\delta_{\text{H-13}}$ : 7,09 ppm : *d*,  $J_{\text{vic}} = 8,5$  Hz) et  $\text{C}_{14}$ : 127,2 ppm ( $\delta_{\text{H-14}}$ : 7,64 ppm : 1H, *dd*,  $J_{\text{vic}} = 8,5$ ,  $J_{\text{meta}} = 2,1$  Hz), un CH en position meta par rapport à  $\text{C}_{14}$  ( $\text{C}_{10}$ : 119,8 ppm ;  $\delta_{\text{H-10}}$ : 7,39 ppm : *d*,  $J_{\text{meta}} = 2,1$  Hz), et un carbone quaternaire engagé dans une jonction de cycle C-O-C ( $\text{C}_{11}$ : 146,8 ppm). Les corrélations des protons aromatiques de ce cycle témoignent également de la présence d'un substituant méthoxy porté par  $\text{C}_{12}$  ( $\delta_{\text{C}}$ : 156,2 ppm), en ortho du pont ether.

Le second système aromatique de la partie bisbenzyl (lié au premier décrit précédemment par un pont éther) est caractérisé par une symétrie totale des signaux de quatre protons aromatiques, voisins deux à deux, et disposés de part et d'autre des deux points de liaison du cycle :  $\delta_{\text{H}11'} = \delta_{\text{H}13'} = 6,90$  ppm (2H, *d*,  $J_{\text{vic}} = 8,6$  Hz), et  $\delta_{\text{H}10'} = \delta_{\text{H}14'} = 7,22$  ppm (2H, *d*,  $J_{\text{vic}} = 8,6$  Hz). Cette partie bisbenzyl est raccordée au reste de la molécule par un  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$ : 39,3 ppm) corrélant sur le spectre HMBC aux protons aromatiques décrits précédemment ( $\text{H}_{10'}$  et  $14'$ ).

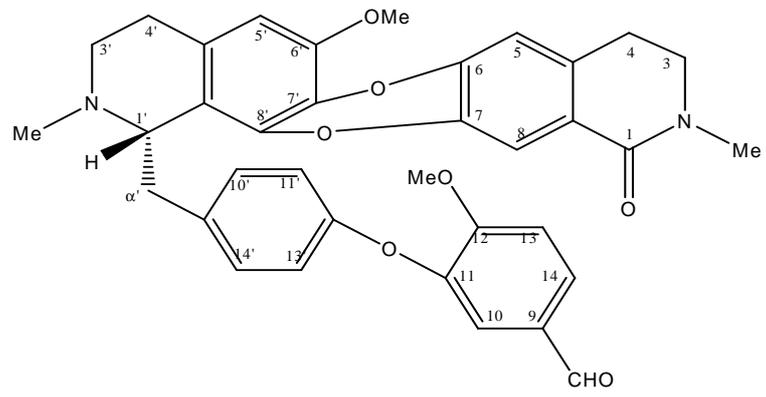
Concernant la partie bis-isoquinoléine de la molécule, nous observons des signaux très similaires à ceux observés pour le composé **1**, à la différence d'une fonction lactame en  $\text{C}_1$  ( $\delta_{\text{C}}$ : 168,3 ppm), de la présence de deux ponts éther  $\text{C}_7\text{-O-C}_8'$  ( $\delta_{\text{C}}$ : 144,5 et 149,3 ppm),  $\text{C}_6\text{-O-C}_7'$  ( $\delta_{\text{C}}$ : 147,7 et 112,0 ppm) et d'un seul groupement méthoxy fixé en  $6'$  ( $\delta_{\text{C}6'}$ : 146,0 ppm) (Figure 27).



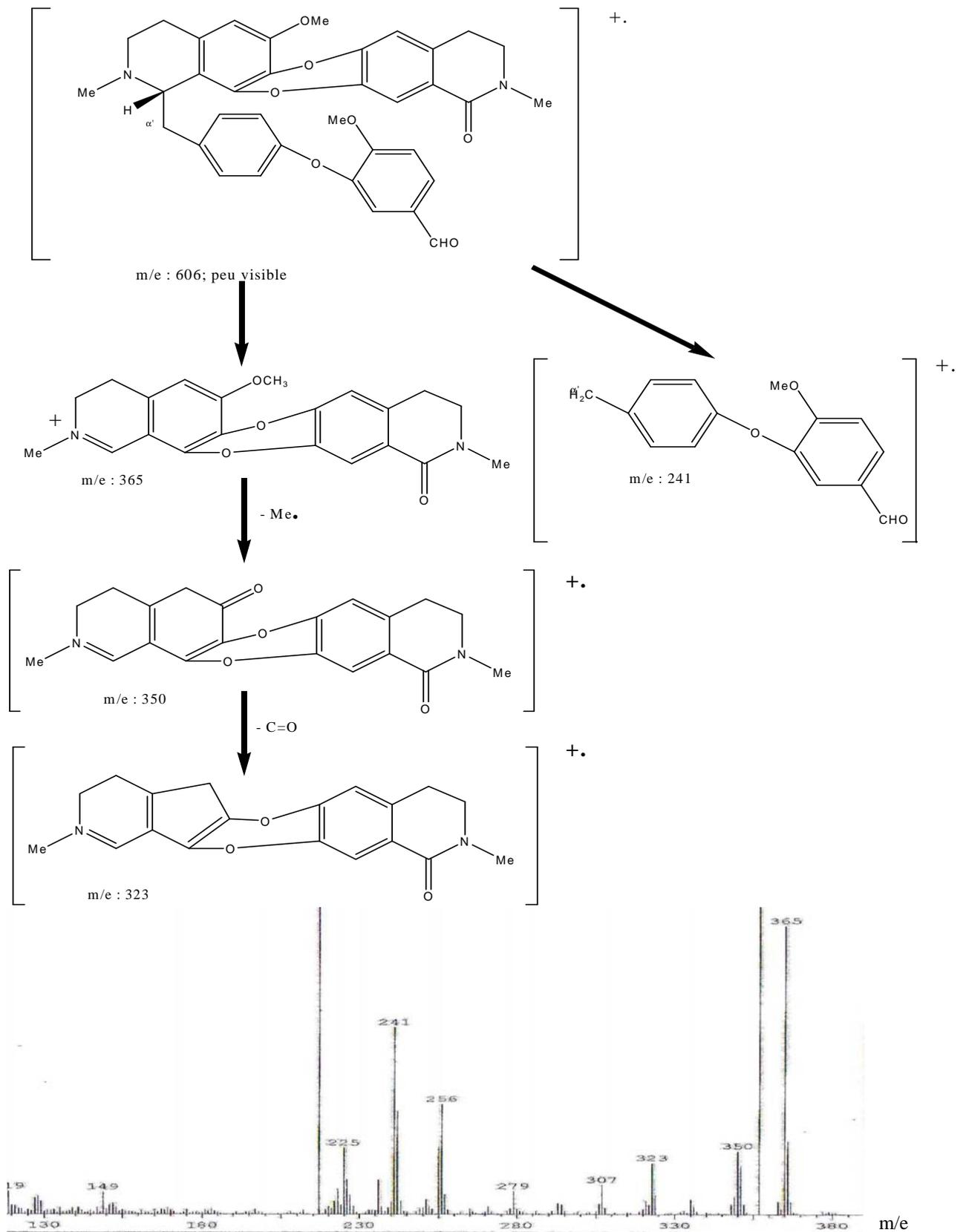
**Figure 27 : Corrélations observées sur le spectre HMBC (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé 2**

L'interprétation des spectres bidimensionnels (HSQC, HMBC, COSY) et les exemples de fragmentations déduits du spectre de masse (réalisé en impact électronique) (Figure 28) ainsi que la comparaison aux données bibliographiques permettent d'identifier le composé **2** à la O-méthylpunjabine [Kanyinda, 1996].

Cette molécule comporte un carbone asymétrique CH<sub>1</sub> (δ<sub>H</sub> : 3,92-3,98 : 1H, m) dont le signal (multiplet) ne permet pas, ici, de déduire les constantes de couplage nécessaires à la détermination de la structure absolue. Cependant, un seul centre asymétrique étant présent sur la molécule, la comparaison du pouvoir rotatoire [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = - 20° (c 0,9, CHCl<sub>3</sub>) avec les données bibliographiques [Kanyinda, 1996] ([α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = - 16° (c 0,7, CHCl<sub>3</sub>)) permet de déduire la configuration *S* de C<sub>1</sub>, et mène à l'identification du composé **2** à la 1'*S* O-méthylpunjabine.



**1'S O-méthylpunjabine**



**Figure 28 : Spectre et exemples de fragmentations en masse (impact électronique) de la S O-méthylpunjabine [Shamma, 1972]**

**Tableau 5 : Déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C (*J-mod*) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) des alcaloïdes 1 et 2**

Position	1S, 1'R rodiasine (1)		1'S O-méthylpunjabine (2)	
	δ <sub>C</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm) (J en Hz)	δ <sub>C</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm) (J en Hz)
<b>1</b>	62,8	4,03 (1H, <i>bd</i> , 7,5, <1)	163,8	
<b>1'</b>	65,1	3,69 (1H, <i>bdd</i> , 3,9, 4,1)	56,3	3,95(1H, <i>m</i> )
<b>3</b>	44,6	2,93-3,47 (2H, <i>m</i> )	48,1	3,53 (2H, <i>t</i> , 6,8)
<b>3'</b>	49,3	2,62-3,31 (2H, <i>m</i> )	45,2	2,68-2,82 (1H, <i>m</i> ) 3,18-3,32 (1H, <i>m</i> )
<b>4</b>	22,7	2,49 (2H, <i>m</i> )	27,3	2,85-3,00 (2H, <i>m</i> )
<b>4'</b>	27,6	2,56-3,05 (2H, <i>m</i> )	23,8	2,28-2,42 (1H, <i>m</i> ) 2,68-2,82 (1H, <i>m</i> )
<b>4a</b>	128,2		125,3	
<b>4'a</b>	125,5		129,2	
<b>5</b>	106,6	6,40 (1H, <i>bs</i> )	114,7	6,76 (1H, <i>s</i> )
<b>5'</b>	113,4	6,40 (1H, <i>bs</i> )	106,8	6,31 (1H, <i>m</i> )
<b>6</b>	151,5		147,7	
<b>6'</b>	147,7		146,0	
<b>7</b>	139,1		144,5	
<b>7'</b>	143,7		112,0	
<b>8</b>	149,3		116,2	7,58 (1H, <i>s</i> )
<b>8'</b>	118,8	7,07 (1H, <i>bs</i> )	149,3	
<b>8a</b>	124,9		134,6	
<b>8'a</b>	127,8		139,3	
<b>α</b>	41,5	2,88 (1H, <i>dd</i> , 14,0, 8,0, H-αs) 2,92 (1H, <i>dd</i> , 14,0, <1,0, H-αr)		
<b>α'</b>	37,6	2,97 (1H, <i>m</i> , H-α's) 3,09 (1H, <i>m</i> , H-α'r),	39,3	2,85-3,00 (2H, <i>m</i> )
<b>9</b>	137,3		130,2	
<b>9'</b>	131,2		137,3	
<b>10</b>	135,4	7,65 (1H, <i>d</i> , 2,1)	119,8	7,39 (1H, <i>d</i> , 2,1)
<b>10'</b>	130,7	6,90 (1H, <i>d</i> , 2,1)	130,8	7,22 (1H, <i>d</i> , 8,6)
<b>11</b>	137,3		146,8	
<b>11'</b>	117,9		117,8	6,90 (1H, <i>d</i> , 8,6)
<b>12</b>	153,2		156,2	
<b>12'</b>	151,8		154,9	
<b>13</b>	110,7	6,87 (1H, <i>d</i> , 8,1)	116,2	7,09 (1H, <i>d</i> , 8,5)
<b>13'</b>	117,0	6,85 (1H, <i>d</i> , 8,1)	117,8	6,90 (1H, <i>d</i> , 8,6)
<b>14</b>	129,5	7,27 (1H, <i>dd</i> , 8,1, 2,1)	127,2	7,64 (1H, <i>dd</i> , 2,1, 8,5)
<b>14'</b>	130,7	7,28 (1H, <i>dd</i> , 8,1, 2,1)	130,8	7,22 (1H, <i>d</i> , 8,6)
<b>MeO-6</b>	56,0	3,83 (3H, <i>s</i> )		
<b>MeO-6'</b>	55,6	3,32 (3H, <i>s</i> )	56,3	3,86 (3H, <i>s</i> )
<b>MeO-7</b>	60,4	3,50 (3H, <i>s</i> )		
<b>MeO-12</b>	56,4	3,80 (3H, <i>s</i> )	59,4	3,96 (3H, <i>s</i> )
<b>CHO-9</b>			190,5	9,80 (1H, <i>s</i> )
<b>Me-2</b>	42,3	2,35 (3H, <i>s</i> )	35,2	3,12 (3H, <i>s</i> )
<b>Me-2'</b>	44,5	2,65 (3H, <i>s</i> )	42,6	2,39 (3H, <i>s</i> )

*bs* : singulet large ; *d* : doublet ; *m* : multiplet ; *s* : singulet

### 4.3. Identification du composé 3 (IID<sub>2</sub>)

Cet alcaloïde, bien qu'isolé du même sous-ensemble de composés, n'appartient pas à la famille des bisbenzylisoquinoléines. En effet, sa masse haute résolution HR-ESI-MS révèle un ion quasi-moléculaire de  $m/z = 330,1214$  ( $M + H^+$ ), pour une formule brute supposée :  $C_{18}H_{19}NO_5$  (26 ppm), ne correspondant pas à celle des macrocycles à deux azotes vus précédemment, mais réagit également de manière positive au réactif de Dragendorff. Les analyses spectrophotométriques supposent la présence de certains groupements fonctionnels tels que :  $IR^{KBr}_{max} \text{ cm}^{-1}$ : 1657, 3400 (lactame) ; UV ( $CHCl_3$ ) :  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 254 (5,1), 287 (5,2), 296 (5,2), 351 (4,3), 362 (4,3) (anthracènes et aromatiques méthoxylés) [De Oliveira, 1987 ; Dos Santos, 2003] ; le pouvoir rotatoire de ce composé est  $[\alpha]^{25}_D : + 3^\circ$  (c 1,7,  $CHCl_3$ ) .

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz,  $CDCl_3$ ) du composé 3 est d'aspect relativement simple. En effet, la partie de champ faible comporte les signaux d'un proton aromatique isolé, sous forme de singulet ( $\delta_H$ : 6,43 ppm) et de deux autres protons aromatiques, vicinaux, à  $\delta_H$ : 7,31 et 8,01 ppm ( $d$ ,  $J_{vic} = 9,5$  Hz). Un autre proton fortement déblindé (N-H) à  $\delta_H$ : 9,17 ppm est également visible, il appartient à la fonction lactame. Le reste du spectre n'est constitué que de 5 singulets, chacun intégrant pour trois protons, correspondant à quatre fonctions méthoxy ( $\delta_H$ : 3,92 ; 3,95 ; 3,96 et 4,06 ppm) et à un méthyle (de déplacement plus faible  $\delta_H$ : 2,78 ppm).

Le spectre RMN-<sup>13</sup>C ( $J$ -mod) confirme la présence de ces 5 groupements fonctionnels ( $\delta_C$ : 23,2, 56,6, 62,1, 62,7 et 64,1 ppm) et précise la nature aromatique des 13 carbones restant (correspondant à trois cycles aromatiques juxtaposés à six sommets chacun dont un possède une fonction lactame), comprenant 10 carbones quaternaires ( $\delta_C$ : 112,4 à 161,9 ppm) dont un porte une fonction cétone ( $\delta_C$ : 161,9 ppm) et trois CH aromatiques ( $\delta_C$ : 113,4, 120,7 et 122,5 ppm). Les données concernant la nature des substituants sont vérifiées par les hypothèses de fragmentations issues de l'analyse du spectre de masse (réalisé en impact électronique) (Figure 30).

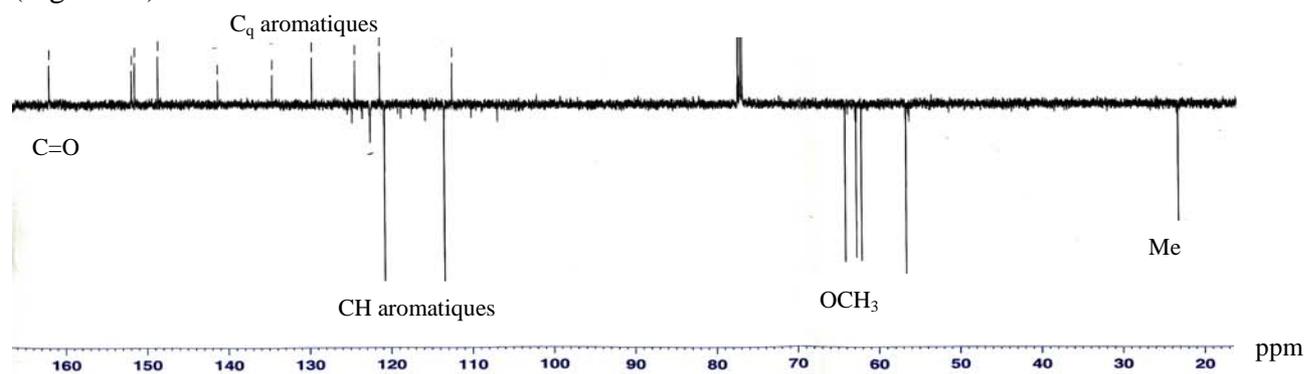
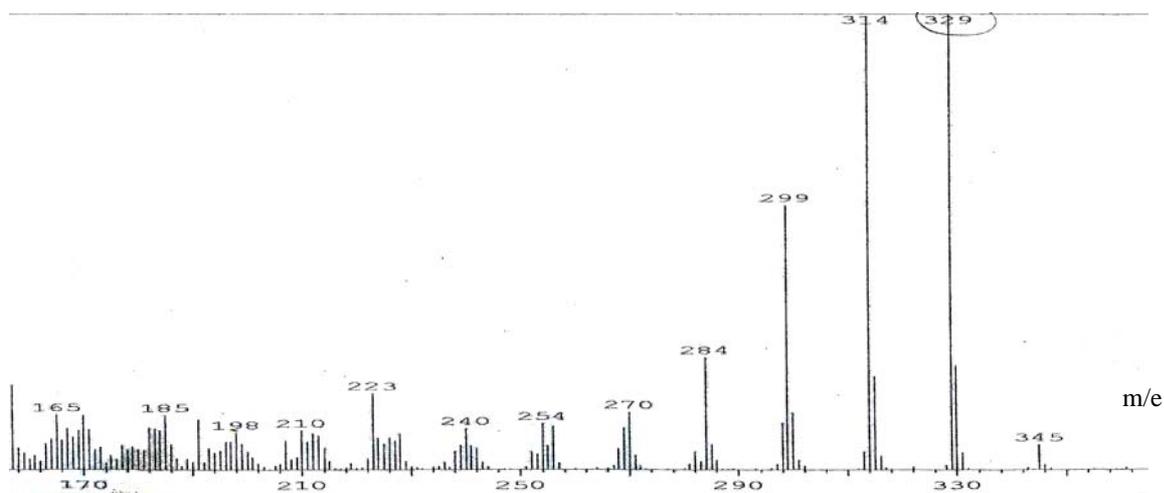
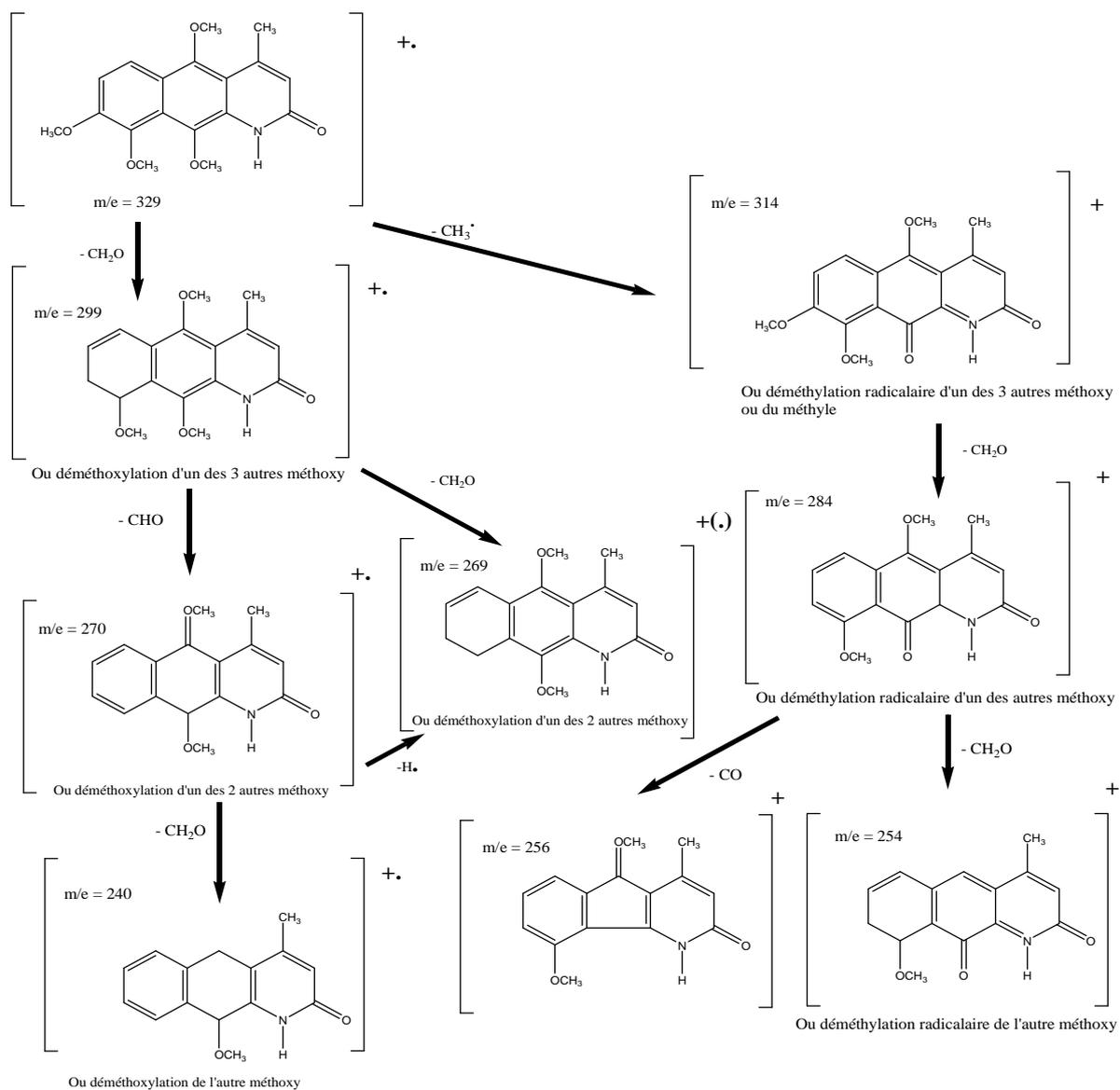


Figure 29 : RMN-<sup>13</sup>C ( $J$ -mod), (500 MHz,  $CDCl_3$ ) du composé 3



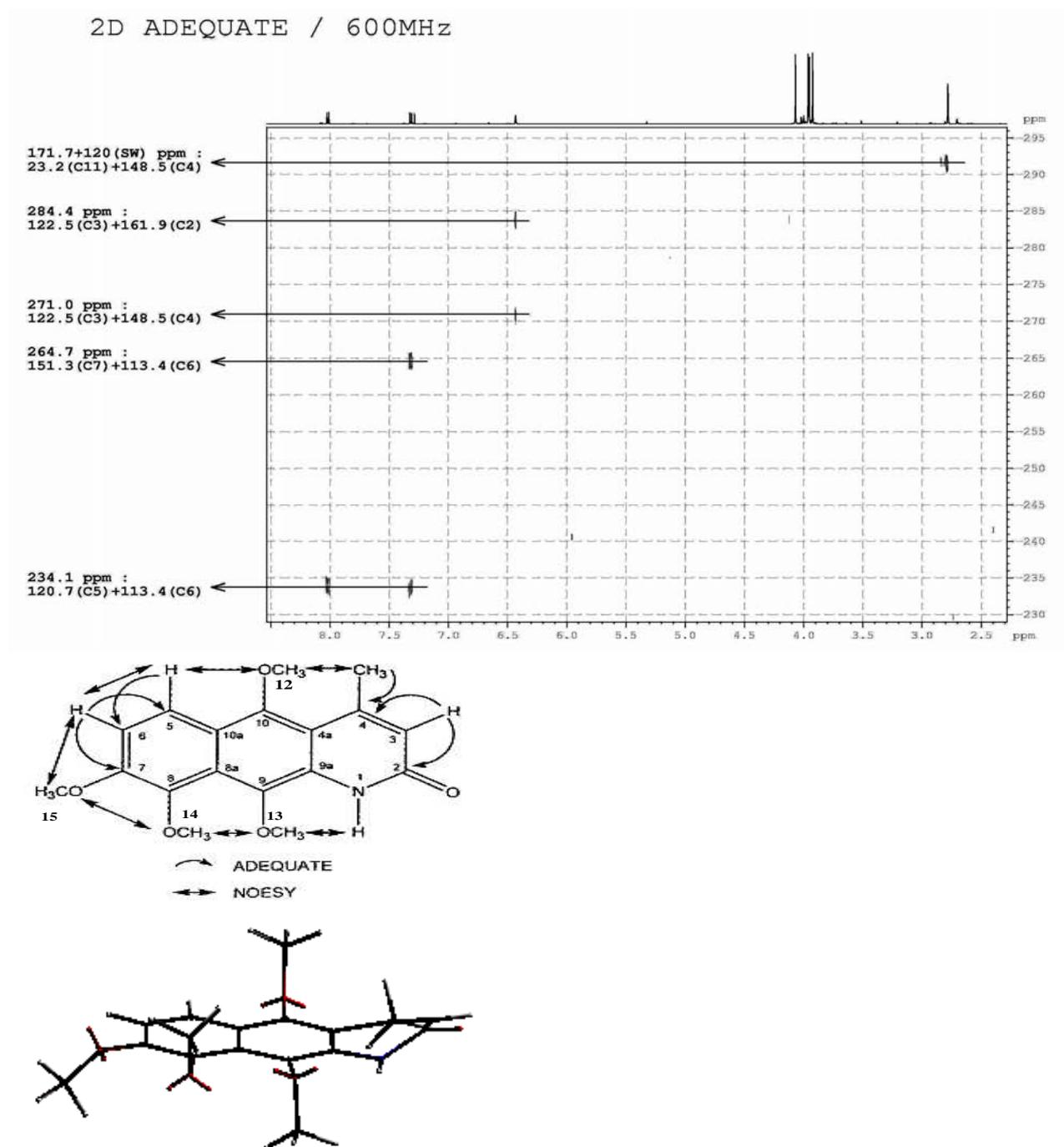
**Figure 30 : Spectre et exemples de fragmentations en masse (impact électronique) de l'aza-anthracène (3) [Budzikiewicz, 1964]**

Les signaux figurant sur le spectre HMBC permettent de caractériser les déplacements chimiques des carbones aromatiques substitués par les différentes fonctions méthoxy (quatre carbones quaternaires à  $\delta_C$ : 134,5, 141,2, 148,5, et 151,3 ppm) ou méthyle ( $\delta_C$ : 151,7 ppm). Par la suite, l'analyse des spectres HMBC ou COSY n'a pas suffi à positionner les carbones au sein de la molécule, ni même l'enchaînement de ces cycles en raison d'un trop grand nombre de corrélations peu spécifiques (de  $J^2$  à  $J^5$ ). Nous avons donc eu recours à deux autres types d'expériences que sont la NOESY (permettant de voir les corrélations des protons dans l'espace) et la 2D- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ADEQUATE (Adequate Sensitivity Double-QUAnTum spECTroscopy) echo-anti-echo qui nous a ici permis de sélectionner les couplages protons-carbones en  $J^2$  (en plus des  $J^1$ ).

Les corrélations observées sur le spectre NOESY ont permis de définir l'ordre d'enchaînement des substituants autour de la structure "plane" constituée des trois cycles aromatiques. L'analyse de ce spectre NOESY démontre les corrélations des protons du méthoxy en position 10 ( $\delta_H$ : 3,96 ppm, 3H, *s*) avec les protons du méthyle en 4 ( $\delta_H$ : 2,78 ppm, 3H, *s*) lui-même corrélant avec le proton aromatique en 3 ( $\delta_H$ : 6,43 ppm, 1H, *s*). D'autre part, nous observons la corrélation des protons de ce méthoxy (en 10) avec le proton aromatique en 5 ( $\delta_H$ : 8,01, 1H, *d*,  $J_{vic} = 9,5$  Hz.). Ce même proton (H-5), dont la constante de couplage est commune au proton vicinal H<sub>6</sub> ( $\delta_H$ : 7,31 ppm, 1H, *d*,  $J_{vic} = 9,5$  Hz), corrèle également en NOESY avec ce dernier. Cet ensemble de corrélations nous permet de déduire l'enchaînement dans l'espace de H<sub>3</sub>/CH<sub>3(11)</sub>/OCH<sub>3(13)</sub>/H<sub>5</sub> et H<sub>6</sub> autour de la structure tricyclique. Enfin, les corrélations NOESY nous permettent également de positionner les trois derniers méthoxy ( $\delta_H$ : 3,92 ; 3,95, et 4,06 ppm) et le proton N-H ( $\delta_H$ : 9,17, *s*) autour de cette structure rigide, mais aussi de préciser la position de l'azote en 1 par rapport au carbonyle en 2 constituant le groupement lactame de la molécule.

Cependant, ces informations ne suffisent pas à la détermination de l'enchaînement des trois cycles (linéaire ou coudé). Pour cela, nous avons utilisé les corrélations observées sur les spectres 2D- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ADEQUATE echo-anti-echo permettant de sélectionner les couplages proton-carbone en  $J^2$  (en plus des  $J^1$ ). Sur ce spectre (Figure 31), nous constatons que le proton aromatique H<sub>3</sub> ( $\delta_H$ : 6,43 ppm) est intercalé entre la cétone en position 2 ( $\delta_C$ : 161,9 ppm) et le C<sub>4</sub> méthylé ( $\delta_C$ : 148,5 ppm) démontrant ainsi la position de la première jonction de cycle en C<sub>4a</sub> et C<sub>9a</sub> ( $\delta_C$ : 112,4 et 129,7 ppm). Enfin, les corrélations en  $J^2$  de H<sub>6</sub> ( $\delta_H$ : 7,31 ppm) avec les carbones C<sub>5</sub> ( $\delta_C$ : 120,7 ppm) et surtout C<sub>7</sub> ( $\delta_C$ : 151,3 ppm) confirment la jonction de cycle au niveau de C<sub>8a</sub> et C<sub>10a</sub> ( $\delta_C$ : 124,3 et 121,3 ppm), ce qui démontre l'enchaînement linéaire des trois cycles de cette structure de type aza-anthracène.

Par ailleurs, le pouvoir rotatoire de ce composé est proche de 0,  $[\alpha]_D^{25} : +2,8^\circ$  (c 1,7,  $\text{CHCl}_3$ ), cela indique une structure optiquement peu active, ce qui confirme un enchaînement des cycles linéaire au détriment d'une forme dite « twistée » ou coudée qui aurait impliqué une chiralité de la molécule.



**Figure 31 : Corrélations observées sur les spectres  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ADEQUATE echo-anti-echo et NOESY de l'aza-anthracène (3) (600 et 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) et vue en trois dimensions.**

Ce composé que nous définissons par "1-aza-7,8,9,10-tétraméthoxy-4-méthyl-2-oxo-1,2-dihydroanthracène" est ici isolé et identifié pour la première fois dans le règne végétal. De

plus, cette famille de molécules est peu connue puisque seul trois autres types de ces composés ont été jusqu' alors isolés d' autres Annonaceae (*Pollyathia suberosa* Roxb., *Annona ambotay* Aubl. et *Annona dioica* St. Hil.) [Thinapong, 2000 ; Tuchinda, 2000].

**Tableau 6 : Déplacements chimiques et corrélations NOESY (500 MHz) et ADEQUATE (600 MHz) dans CDCl<sub>3</sub> de l' alcaloïde 1-aza-7,8,9,10-tétraméthoxy-4-méthyl-2-oxo-1,2-dihydroanthracène (3)**

Position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) ( <i>J</i> en Hz)	Corrélations <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY	Corrélations <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C ADEQUATE echo-anti-echo en <i>J</i> <sub>2</sub>
1		9,17 (1H, <i>s</i> )	H <sub>13</sub>	
2	161,9			
3	122,5	6,43 (1H, <i>s</i> )	H <sub>11</sub>	C <sub>2</sub> , C <sub>4</sub>
4	148,5			
4a	112,4			
5	120,7	8,01 (1H, <i>d</i> , 9,5)	H <sub>6</sub> , H <sub>12</sub>	C <sub>6</sub>
6	113,4	7,31 (1H, <i>d</i> , 9,5)	H <sub>5</sub>	C <sub>5</sub> , C <sub>7</sub>
7	151,3			
8	141,2			
8a	124,3			
9	134,5			
9a	129,7			
10	151,7			
10a	121,3			
11	23,2	2,78 (3H, <i>s</i> )	H <sub>12</sub> , H <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
12	64,1	3,96 (3H, <i>s</i> )	H <sub>5</sub> , H <sub>11</sub>	
13	56,6	4,06 (3H, <i>s</i> )	H <sub>2</sub> , H <sub>14</sub>	
14	62,1	3,92 (3H, <i>s</i> )	H <sub>13</sub> , H <sub>15</sub>	
15	62,7	3,95 (3H, <i>s</i> )	H <sub>6</sub> , H <sub>14</sub>	

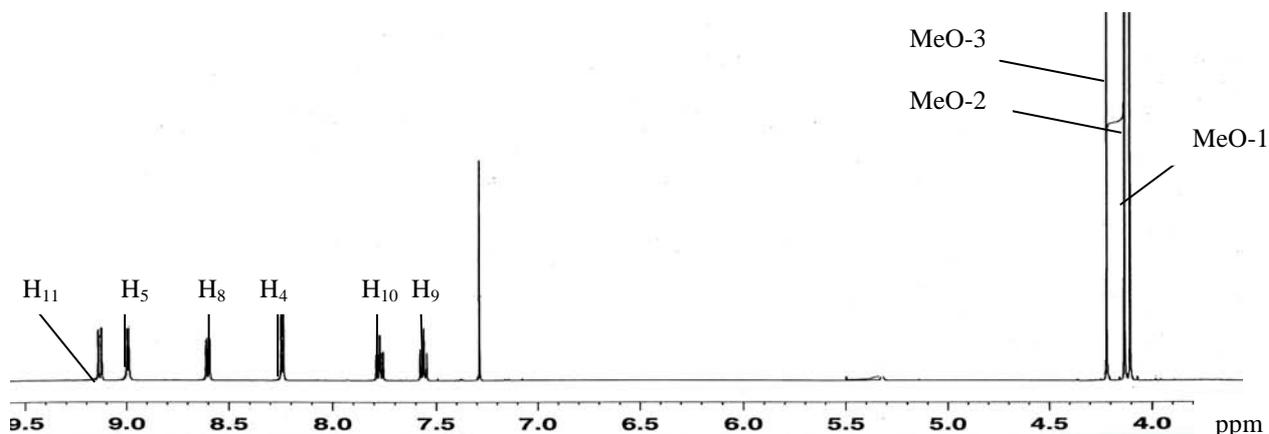
#### 4.4. Identification du composé 4 (IIC<sub>3</sub>)

Cet alcaloïde se présente sous la forme de cristaux bruns et se caractérise, en spectrométrie de masse HR-ESI-MS, par un ion quasi-moléculaire de  $m/z = 323,3421$  ( $M + H^+$ ) pour une formule brute supposée (16 ppm) : C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>. La spectrophotométrie infrarouge (IR<sup>KBr</sup>) comprend une bande d'absorption à 1665 cm<sup>-1</sup> indiquant la présence d'une cétone conjuguée. Le spectre d'absorption en UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 233 (4,3), 238 (4,3), 274 (4,3), 315 (3,7), 436 (3,8) est similaire à celui des noyaux oxo-dibenzo-quinoléines [Bick, 1965].

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de ce composé ne comprend que des protons aromatiques et des fonctions O-Me.

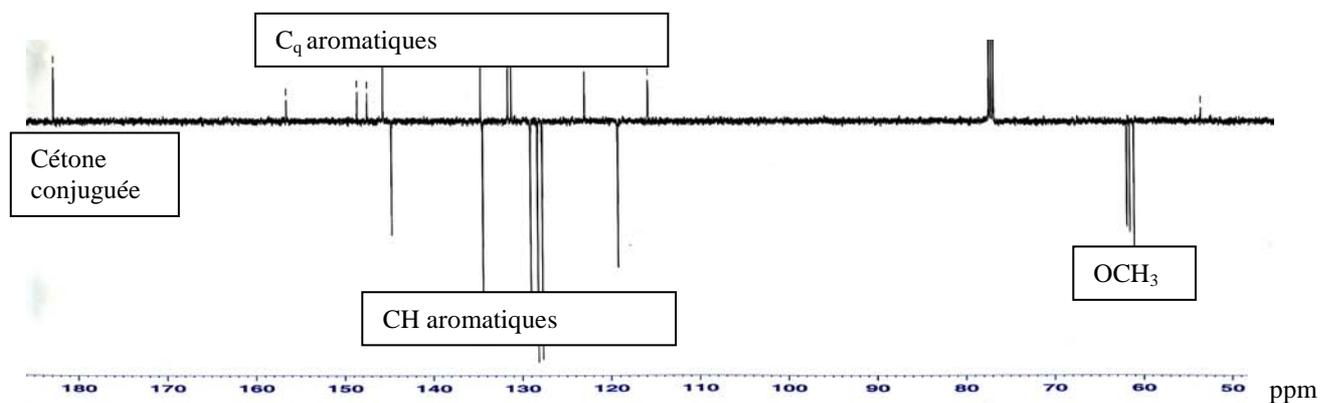
Les protons aromatiques appartiennent à deux groupes. Le premier est constitué de deux protons vicinaux en  $\alpha$  et  $\beta$  d' un azote et de déplacements  $\delta_H$  : 8,20 et 8,96 ppm ( $J_{vic} = 5,3$  Hz). Le second système comporte quatre protons vicinaux,  $\delta_H$  : 7,56 (1H, *dt*,  $J = 8,1, 1,0$  Hz), 7,77 (1H, *dt*,  $J = 8,1, 7,0$  Hz) ; 8,57 (1H, *dd*,  $J = 8,1 ; 1,1$  Hz) et 9,10 (1H, *dd*,  $J = 8,1, 1,1$  Hz).

Les protons des trois substituants O-Me ont des déplacements très proches les uns des autres à  $\delta_H$  : 4,07 ; 4,10 et 4,18 ppm sous forme de singulets, chacun intégrant pour trois protons (Figure 32).



**Figure 32 : Spectre 1 D RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la O-méthyl-moschatoline**

L'analyse du spectre RMN-<sup>13</sup>C (*J-mod*) met en évidence l'existence de 19 carbones dont les déplacements chimiques et la position des signaux permettent de différencier 10 carbones quaternaires (de 115,7 à 182,7 ppm) dont un appartenant à une cétone conjuguée ( $\delta_C$  : 182,7 ppm), 6 CH aromatiques (de 119,1 à 144,6 ppm), et 3 CH<sub>3</sub> appartenant à des fonctions méthoxy de déplacements chimiques très proches (de 61,0 à 61,8 ppm), ce qui confirme les informations données par le spectre RMN-<sup>1</sup>H.



**Figure 33 : RMN-<sup>13</sup>C (*J-mod*), (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé 4**

La présence de 6 carbones quaternaires aromatiques engagés dans des jonctions de cycles (c'est à dire les carbones quaternaires non substitués par l'un des 3 groupements méthoxy ou par la cétone) ainsi que la comparaison de ces données RMN 1D aux valeurs fournies par la bibliographie [Marsaioli, 1980], mettent en évidence une structure de type

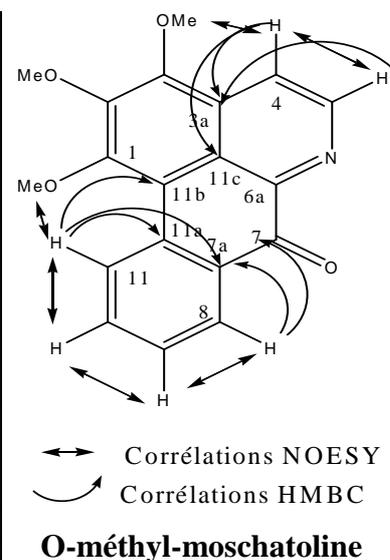
oxo-aporphine. L'interprétation de la fragmentation figurant sur les spectres de masse (réalisé en impact électronique) confirme la présence des trois substituants méthoxy (Figure 34).

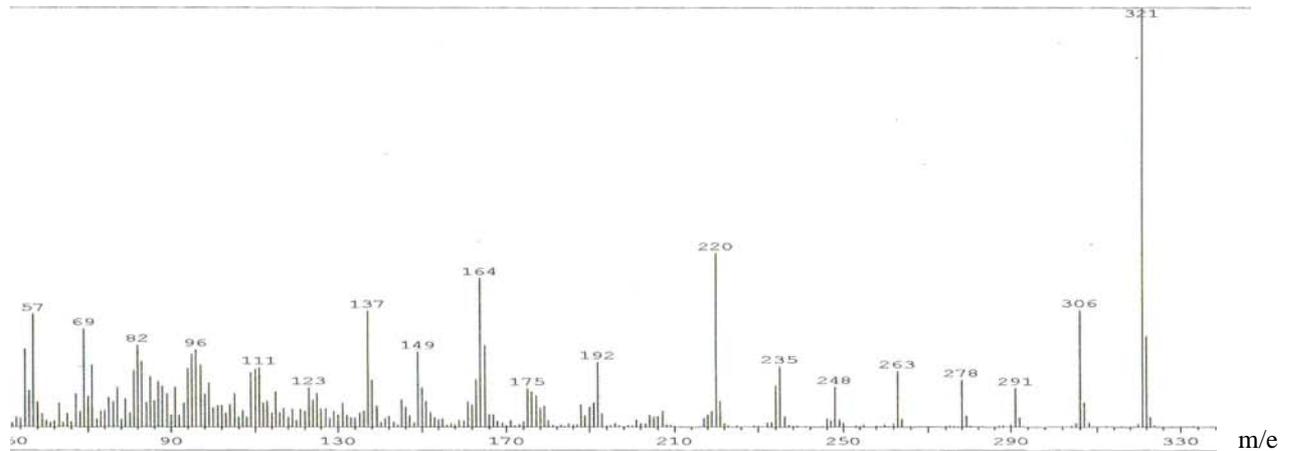
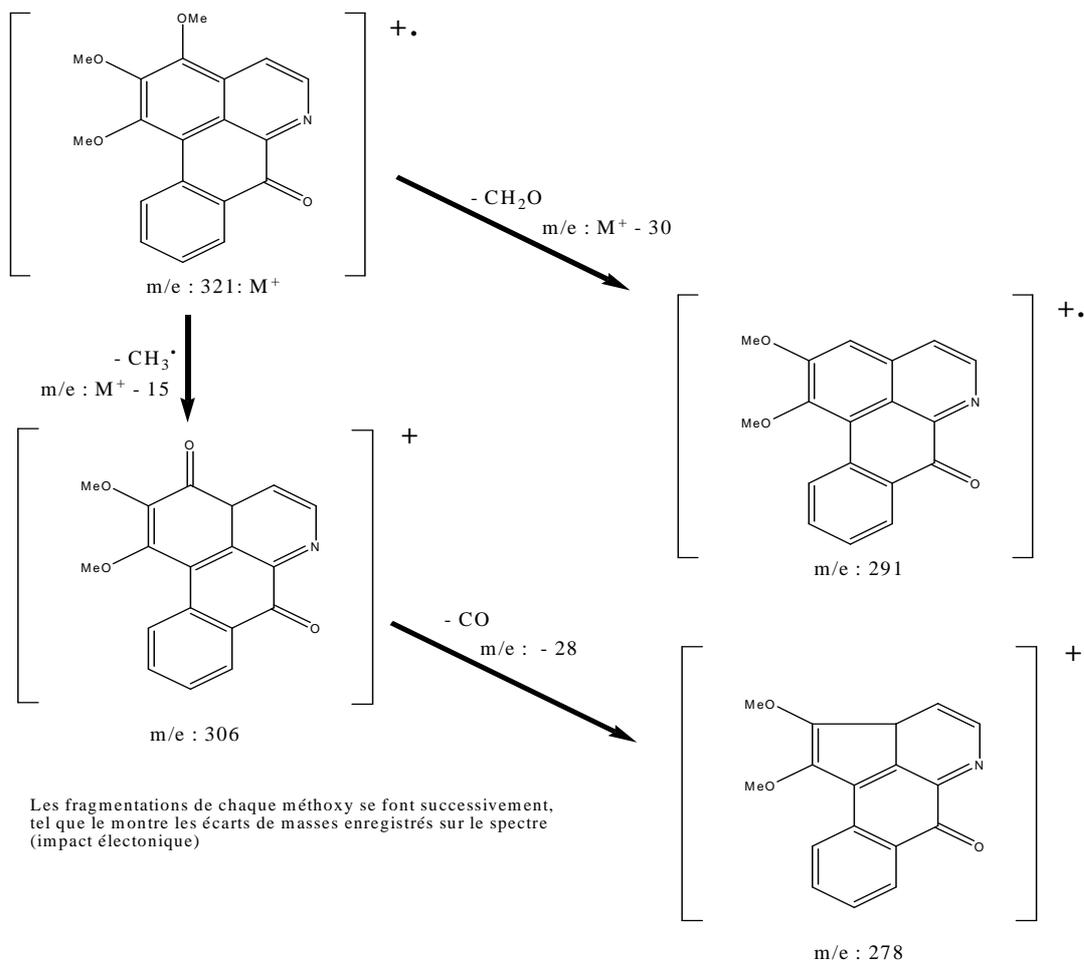
Les corrélations observées sur le spectre HMBC permettent d'attribuer les déplacements chimiques à chaque carbone quaternaire substitué par un méthoxy ( $\delta_C$  : 147,3, 148,5 et 156,5 ppm). Nous observons également la corrélation de l'un de ces carbones ( $\delta_C$  : 148,5 ppm, C<sub>3</sub>) avec le proton aromatique en position  $\beta$  par rapport à l'azote ( $\delta_H$  : 8,20 ppm, *d*,  $J_{vic} = 5,3$  Hz, H<sub>4</sub>), ainsi que la corrélation de ce même proton aromatique avec deux carbones quaternaires impliqués dans des jonctions de cycles ( $\delta_C$  : 122,9 ppm, C<sub>3a</sub>, et  $\delta_C$  : 131,1 ppm, C<sub>11c</sub>, ce dernier ne corrélant pas avec H<sub>5</sub>), ce qui permet d'identifier la partie "iso-quinoléine" de la molécule. Les corrélations observées pour l'autre système de protons aromatiques (les 4 protons vicinaux : H-8, H-9, H-10 et H-11) permettent d'attribuer les déplacements chimiques de trois carbones impliqués dans les jonctions de cycles ( $\delta_C$  : 115,7 ppm, C<sub>11b</sub> ; 131,5 ppm, C<sub>11a</sub> ; 134,6, C<sub>7a</sub>) ainsi que de positionner la cétone en C<sub>7</sub>.

Enfin, les corrélations observées sur le spectre NOESY (Tableau 7) entre les protons du groupement méthoxy en position 3 ( $\delta_H$  : 4,18 ppm) et le proton aromatique (H-4) en position  $\beta$  par rapport à l'azote, ainsi que la corrélation MeO-1 ( $\delta_H$  : 4,07 ppm) avec H-11 ( $\delta_H$  : 9,10 ppm) permettent de localiser les substituants pour finalement identifier le composé **4**. Il s'agit de la O-méthyl-moschatoline [**Mahmood, 1986**].

**Tableau 7 : Déplacements chimiques  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , et corrélations NOESY du composé 4, la O-méthylmoschatoline (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

Position	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (J en Hz)	Corrélations $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC
<b>1</b>	147,3		
<b>2</b>	156,5		
<b>3</b>	148,5		
<b>3a</b>	122,9		
<b>4</b>	119,1	8,20 (1H, <i>d</i> , 5,3)	$\text{C}_{3\text{a}}$ , $\text{C}_5$ , $\text{C}_{11\text{c}}$ , $\text{C}_3$
<b>5</b>	144,6	8,96 (1H, <i>d</i> , 5,3)	$\text{C}_{3\text{a}}$ , $\text{C}_4$
<b>6</b>			
<b>6a</b>	145,6		
<b>7</b>	182,7		
<b>7a</b>	134,6		
<b>8</b>	129,0	8,57 (1H, <i>dd</i> , 8,1, 1,1)	$\text{C}_7$ , $\text{C}_{7\text{a}}$ , $\text{C}_9$ , $\text{C}_{10}$ , $\text{C}_{11\text{a}}$
<b>9</b>	134,4	7,56 (1H, <i>dt</i> , 8,1, 1,0)	$\text{C}_{7\text{a}}$ , $\text{C}_8$ , $\text{C}_{10}$ , $\text{C}_{11}$
<b>10</b>	128,2	7,77 (1H, <i>dt</i> , 8,1, 7,0)	$\text{C}_8$ , $\text{C}_9$ , $\text{C}_{11}$ , $\text{C}_{11\text{a}}$
<b>11</b>	127,7	9,10 (1H, <i>dd</i> , 8,1, 1,1)	$\text{C}_{7\text{a}}$ , $\text{C}_9$ , $\text{C}_{10}$ , $\text{C}_{11\text{a}}$ , $\text{C}_{11\text{b}}$
<b>11a</b>	131,5		
<b>11b</b>	115,7		
<b>11c</b>	131,1		
<b>MeO-1</b>	61,5	4,07 (3H, <i>s</i> )	$\text{C}_1$
<b>MeO-2</b>	61,0	4,10 (3H, <i>s</i> )	$\text{C}_2$
<b>MeO-3</b>	61,8	4,18 (3H, <i>s</i> )	$\text{C}_3$





**Figure 34 : Spectre et exemples de fragmentations en masse (impact électronique) de la O-méthyl-moschatoline**

## 5. Activité anti-paludique des composés isolés de *P. cuspidata*

### 5.1. Activité *in vitro*

Les techniques permettant d'évaluer l'activité *in vitro* ou *in vivo* des échantillons sur *P. falciparum* sont détaillées dans la partie intitulée "Matériel et méthodes" [Trager, 1976 ; Desjardins, 1979 ; Lambros, 1979 ; Van Huyssen, 1993 ; Benoit, 1996]. Les composés les plus actifs sont ceux appartenant à la famille des bisbenzylisoquinoléines (rodiasine : **1** et O-méthyl-punjabine : **2**). L'aza-anthracène **3**, possède une activité antiplasmodiale très faible et non sélective (ce composé est à considérer comme n'ayant pas d'activité antiplasmodiale), et l'aporphine **4** (O-méthyl-moschatoline) est inactive (Tableau 8).

**Tableau 8 : Activités antiplasmodiale et cytotoxique *in vitro* des quatre composés isolés de *P. cuspidata* tests à l'hypoxanthine tritiée**

Tests Composés	Activité sur <i>P. falciparum</i> (souches chloroquinoresistantes), CI <sub>50</sub> (µM)		Cytotoxicité CI <sub>50</sub> (µM)	Index de sélectivité
	FcB1	FcM29	MCF7	
<b>(1)</b>	1,1 ± 0,8	1,4 ± 0,1	28,1 ± 7,9	24,6
<b>(2)</b>	13,7 ± 9,9	12,5 ± 2,1	5,5 ± 1,6	0,4
<b>(3)</b>	42,9 ± 28,2	40,9 ± 2,1	43,9 ± 2,1	1,0
<b>(4)</b>	> 100	>100	46,7 ± 2,9	0,5
<b>Totum alcaloïdique</b>	3,5 µg/ml ± 1,3	ND	24,1 µg/ml ± 5,5	6,9
<b>Chloroquine</b>	0,2	0,5	> 100	>500 (FcB1)
<b>Doxorubicine</b>	ND	ND	4,5	

Les expériences ont été réalisées en triplicat et les résultats sont exprimés en µM sauf pour le totum alcaloïdique (en µg/ml), ND: Non Déterminé.

Index de sélectivité : CI<sub>50</sub> cytotoxicité/CI<sub>50</sub> FcB1

Les tests ont été réalisés sur deux souches de *P. falciparum* chloroquino-résistantes de provenances différentes (FcB1 est issue de Colombie et FcM29 provient du Cameroun et douée d'un niveau de résistance à la chloroquine plus élevée). Nous observons une activité antiplasmodiale intéressante de la rodiasine (CI<sub>50 moy.</sub> : 1,2 µM) pour une cytotoxicité modérée (CI<sub>50</sub> : 28,1 µM), ce qui témoigne d'une bonne sélectivité antiplasmodiale du composé. Cette activité est d'autant plus intéressante qu'elle porte sur des souches résistantes à la chloroquine, et peut donc constituer une alternative thérapeutique à ce médicament et ses dérivés.

Le composé **2**, une séco-bisbenzylisoquinoléine, ne possède qu'une activité antiplasmodiale moyenne ( $CI_{50 \text{ moy.}}$  : 13,1  $\mu\text{M}$ ) et non spécifique puisque sa cytotoxicité est plus importante ( $CI_{50}$  : 5,5  $\mu\text{M}$ ).

Enfin, les composés **3** et **4** ne témoignent que peu ou pas d'intérêt concernant l'activité biologique antiplasmodiale ou cytotoxique.

La meilleure sélectivité (24,6) est donc obtenue avec la rodiasine, c'est pourquoi ce composé a été choisi pour des tests *in vivo* sur la souris.

## 5.2. Activité *in vivo* de la rodiasine (test de Peters)

Le test de « Peters » consiste à infecter des souris par une souche de *Plasmodium vinckei petteri* et à les traiter deux heures plus tard et une fois par jour pendant les 3 jours suivants, puis à évaluer la parasitémie (à  $J_5$ ) et à suivre la mortalité des animaux.

**Tableau 9 : Parasitémie des souris infectées (% de globules rouges parasités)**

Souris Jours	Contrôle	Chloroquine	Chloroquine	Rodiasine
	DMSO	1 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
Parasitémie moyenne $J_5$	38,0 $\pm$ 13,7 dont 2 souris décédées sur 10	33,0 $\pm$ 14,4	0	20,1 $\pm$ 7,5
% d'Inhibition	0	13	100	47

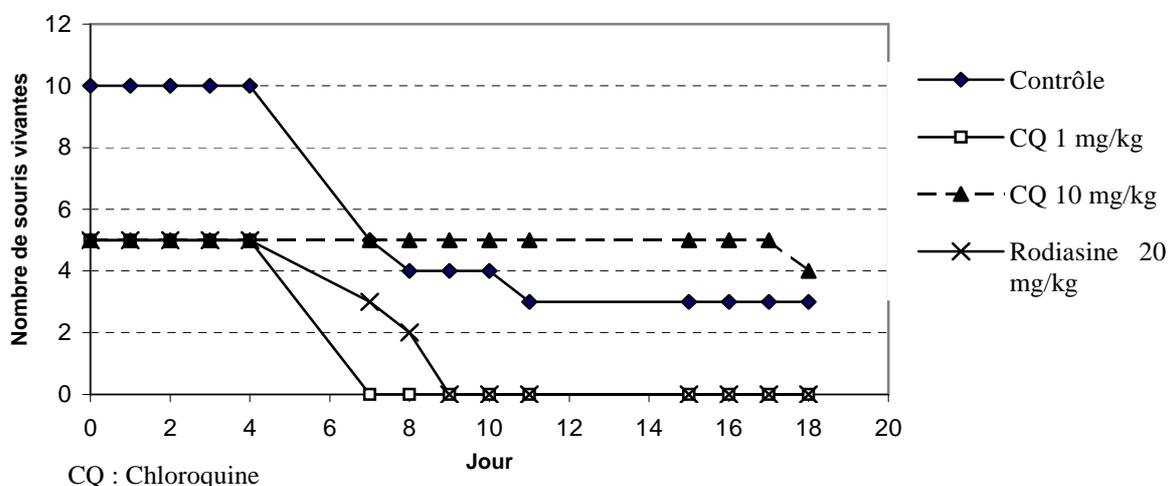
Nous constatons, d'après les valeurs figurant dans le tableau 7, que les souris traitées par 20 mg/kg de rodiasine ont une parasitémie deux fois plus faible que les souris non traitées (témoins DMSO). La rodiasine possède donc une activité antipaludique modérée (par rapport à celle de la chloroquine).

L'évaluation de la parasitémie au 5<sup>ème</sup> jour permet également de déduire la  $CI_{50}$  *in vivo* de la rodiasine. En effet, si nous considérons que le lot de souris témoin (DMSO, sans traitement dont la parasitémie est égale à 38 %) correspond à un pourcentage d'inhibition égal à 0, nous pouvons déduire qu'une parasitémie deux fois moins élevée (20%, obtenue pour les souris traitées à 20 mg/kg par la rodiasine) correspond à la  $CI_{50}$  de la rodiasine *in vivo*. La dose inoculée (20 mg/kg) est donc très proche de la  $CI_{50}$  antiplasmodiale *in vivo* de la rodiasine.

**Tableau 10 : Mortalité des souris infectées**

Inoculats	Contrôle	Chloroquine	Chloroquine	Rodiasine
	DMSO (10 souris)	1 mg/kg (5 souris)	10 mg/kg (5 souris)	20 mg/kg (5 souris)
<b>J<sub>0</sub> : inoculation du parasite puis de la rodiasine</b>	0	0	0	0
<b>J<sub>1</sub> : injection de rodiasine</b>	0	0	0	0
<b>J<sub>2</sub> : injection de rodiasine</b>	0	0	0	0
<b>J<sub>3</sub> : injection de rodiasine</b>	0	0	0	0
<b>J<sub>4</sub> : Evaluation de la parasitémie</b>	0	0	0	0
<b>J<sub>5</sub></b>	5	5	0	2
<b>J<sub>6</sub></b>	1	/	0	1
<b>J<sub>7</sub></b>	0	/	0	2
<b>J<sub>8</sub></b>	0	/	0	/
<b>J<sub>9</sub></b>	1	/	0	/
<b>J<sub>10</sub> à J<sub>22</sub></b>	/	/	1	/
<b>J<sub>23</sub> : Reste</b>	3	0	4	0

Animaux : Souris Swiss femelles (22 g +/- 2) infectées par *Plasmodium vinckei* à raison de  $1.10^7$  parasites/souris.  
Voie d'administration : Intra-péritonéale.



**Figure 35 : Evolution de la mortalité des souris au cours du temps**

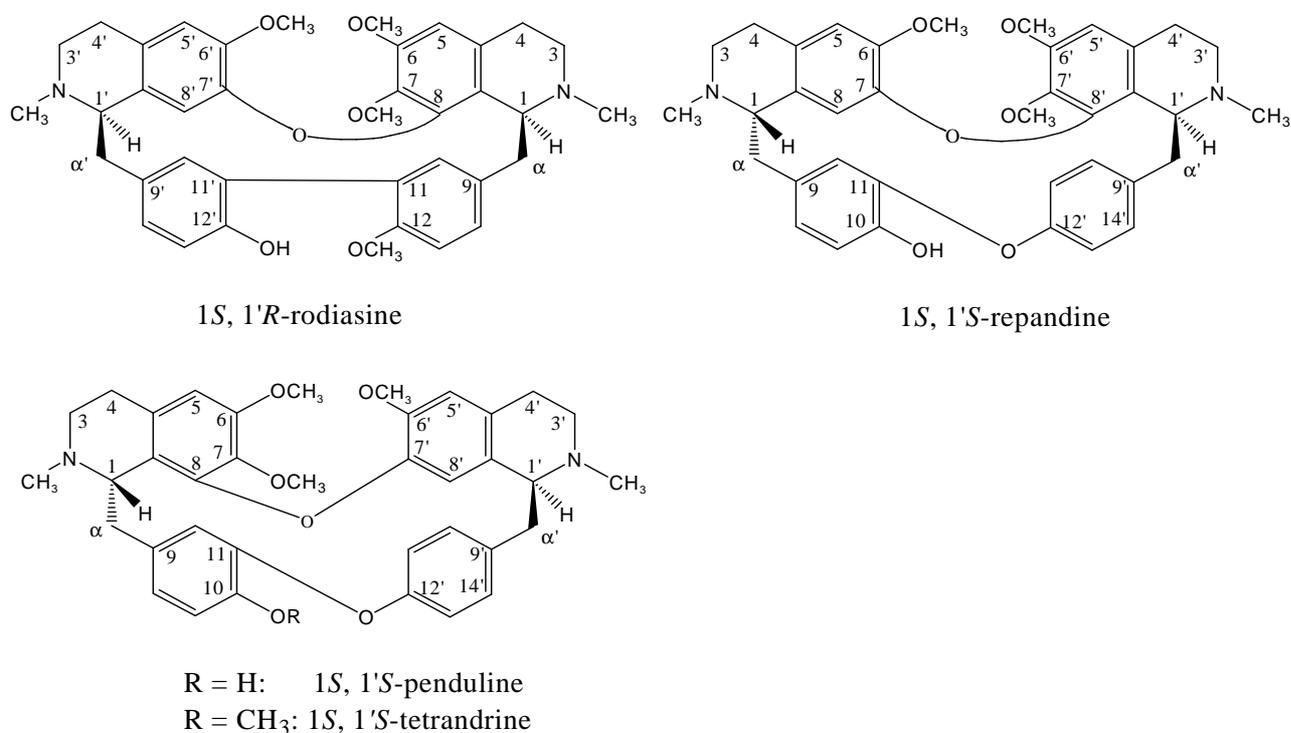
Le suivi de la mortalité des souris montre une très faible activité anti-paludique de la rodiasine (Tableau 9). En effet, l'espérance de vie d'une souris non traitée ou traitée à 1 mg/kg de chloroquine est quasi-similaire à celle d'une souris traitée à la rodiasine (7 à 8 jours). Une différence est cependant observée au niveau des courbes tendant à prouver une résistance contre le parasite plus importante des souris traitées à la rodiasine (Figure 35).

D'après ces données nous pouvons conclure à une activité *in vivo* très modérée de la molécule et/ou à un sous-dosage (20 mg/kg ne serait pas une posologie suffisante). Par extrapolation, la posologie potentiellement curative serait au minimum de 50 mg/kg. De telles

quantités génèreraient probablement trop d'effets secondaires, c'est pourquoi les tests *in vivo* n'ont pas été poursuivis.

Pharmacologiquement, les bisbenzylisoquinoléines peuvent avoir des activités variées : antitumorale (tétrandrine), antituberculeuse (cépharantine), hypotensive (penduline), mais la propriété la plus utilisée repose sur l'activité curarisante (ex. : tubocurarine des Menispermaceae) [Bruneton, 1999].

De nombreuses études témoignent également de l'activité anti-paludique de cette famille chimique [Angerhofer, 1999]. Certains de ces composés tels que la (-)-répandine (1*S*, 1'*S*) dont la structure est proche de la rodiasine possèdent un index de sélectivité supérieur à 300 et comparable à celui de la quinine.



Les relations structure-activité de ces molécules, encore peu connues, soulignent l'importance de la substitution des azotes (ne devant être ni quaternaires ni oxydés) et de la configuration absolue des deux carbones asymétriques ainsi que de la faible lipophilie de la molécule (réduisant la toxicité). Le mécanisme d'action (démonstré pour la tétrandrine) serait d'inhiber la synthèse des nucléoprotéines et des protéines dans les cellules cancéreuses (*in vitro* et *in vivo*). De plus, des études réalisées sur une autre bisbenzylisoquinoléine, la penduline [Valentin, 1997], prouvent que l'activité antiplasmodiale maximale est observée au moment de la synthèse nucléotidique [Basco, 1994].

Enfin, l'activité antiplasmodiale de la (1*S*, 1'*R*) rodiasine concerne à la fois la souche sensible à la chloroquine et la souche résistante. Or, il est prouvé que les bisbenzylisoquinoléines peuvent potentialiser l'activité de la chloroquine [**Frappier, 1996**]. Ces constats expérimentaux renforcent l'intérêt thérapeutique de ce type de molécules, notamment contre des souches plasmodiales résistantes aux anti-paludiques classiques.

# E      ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE BIOGUIDÉE DE *TAPIRIRA GUIANENSIS* Aubl.

## 1. Description botanique

### 1.1. Situation phylogénique

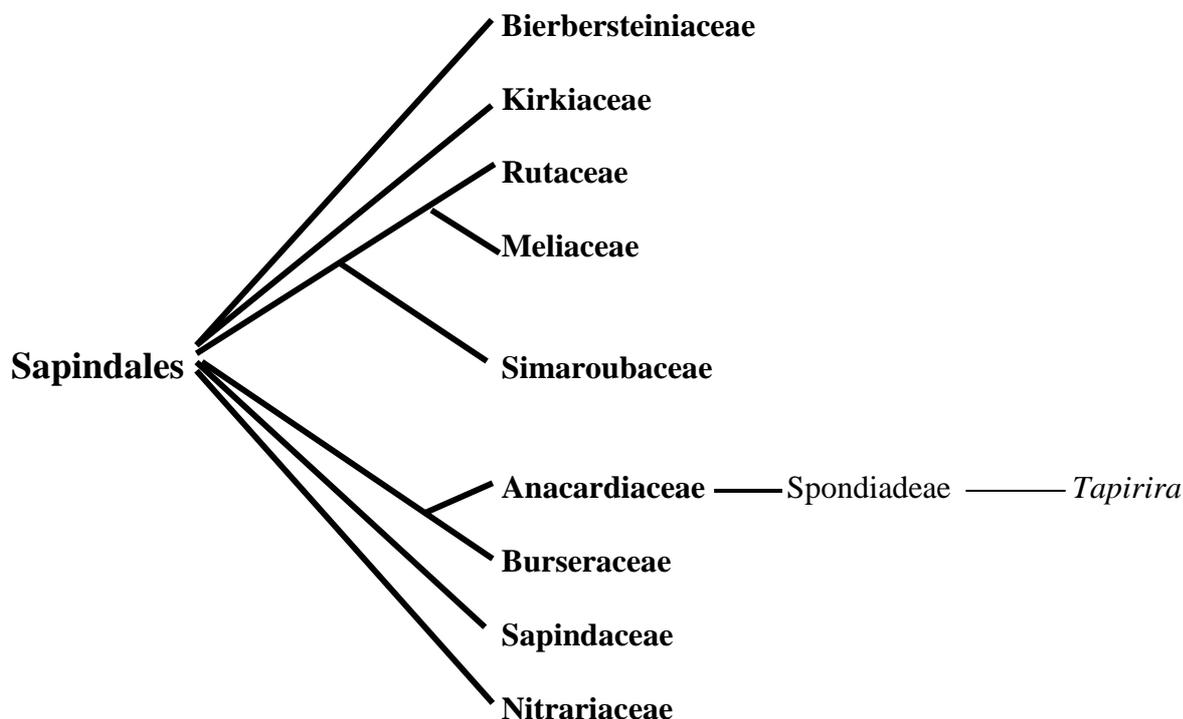
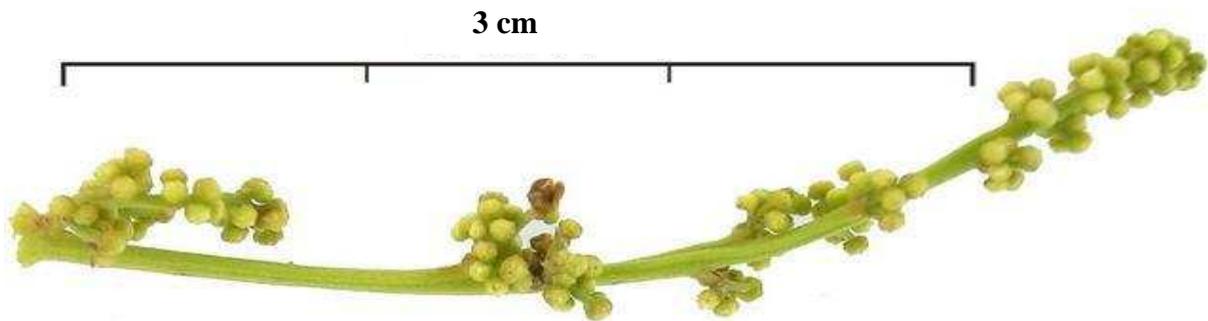


Figure 69 : Position systématique du genre *Pseudoxandra* au sein des Magnoliales  
(<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/>)

### 1.2. Classification (<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/>)

Embranchement :	Spermatophytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Sapindales
Famille :	Anacardiaceae
Sous-famille :	Spondiadeae
Genre :	<i>Tapirira</i> Aubl.
Espèce :	<i>Tapirira guianensis</i> Aubl.

### 1.3. Description



**Figure 70 : Inflorescence de *T. guianensis***



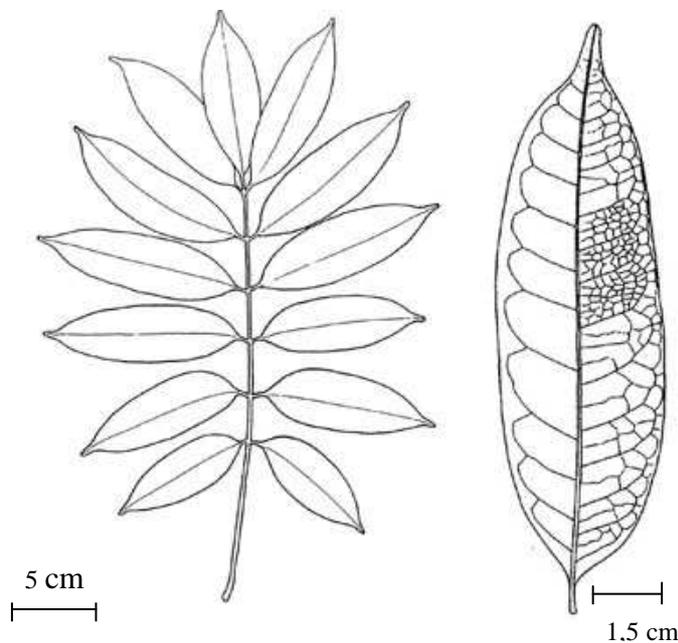
**Figure 71 : Rameau fructifère**

([http://striweb.si.edu/bocas\\_database.doc](http://striweb.si.edu/bocas_database.doc))

Le genre *Tapirira* (créé par Fusée d'Aublet, 1720-1778) est pantropical, il comprend une quinzaine d'espèces réparties en Asie, en Afrique et en Amérique. L'espèce *Tapirira guianensis* s'étend sur la quasi totalité de l'Amazonie. En forêt de formation secondaire (Nord de la Guyane...), cet arbre reste de taille modeste (environ 30 m) alors que son port est plus imposant dans les forêts primaires (Brésil...). Les contreforts de cet arbre sont peu épais, s'éloignant largement du tronc.

L'écorce est gris clair à brun rouge, lisse lorsque l'arbre est jeune, puis divisée par des crevasses irrégulières et sinueuses avec exfoliation du rhytidome (couche externe du liège vouée à l'exfoliation). De petites lenticelles éparses ou disposées en lignes longitudinales sont visibles sur l'écorce. L'écorce interne, fibreuse et stratifiée, est rosâtre veinée de blanc, plus claire près du cambium. La section exsude de petites gouttelettes de résine blanchâtres et exhale une faible odeur balsamique sucrée.

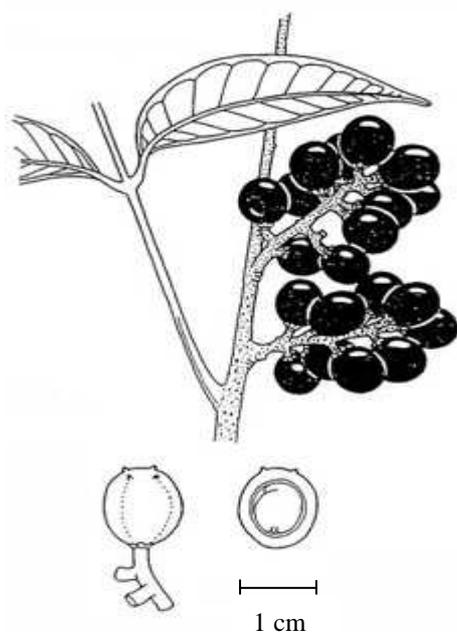
Les feuilles sont alternes (Figure 72), sans stipules, imparipennées et rassemblées en étoile à l'extrémité des rameaux. Les folioles en nombre variable (de 5 à 15) sont glabres et oblongs (en moyenne 10 x 3,5 cm). La base est faiblement asymétrique et décurrente sur un pétiole de 6 mm et le sommet est pourvu d'un acumen arrondi. La nervure principale, saillante en dessous, présente 12 à 15 paires de nervures secondaires se raccordant en arceaux. Les nervilles sont peu distinctes et disposées en réseau lâche.



**Figure 72 : Feuille et foliole**

L'inflorescence est un long panicule terminal ou axillaire densément couvert de très petites fleurs blanches à jaunâtres (Figure 70). La fleur est souvent unisexuée, parfois hermaphrodite surmontant un pédicelle de 2 mm. Le calice gamosépale se compose de 5 lobes deltoïdes (0,5 mm), la corolle est faite de 5 pétales libres oblongs (2 mm) érigés puis réfléchis. Les 10 étamines sont insérées sur un disque à 10 lobes. La fleur femelle possède un ovaire ovoïde à un lobe (1,5 mm), surmonté de 5 styles disjoints (0,3 mm).

Le fruit est une petite drupe subglobuleuse (10 x 8 mm) à peau lisse jaune puis noire, conservant les styles atrophiés (Figure 71). Le mésocarpe, peu épais et juteux, est comestible, il entoure un noyau rugueux contenant une seule graine.



**Figure 73 : Fruits**

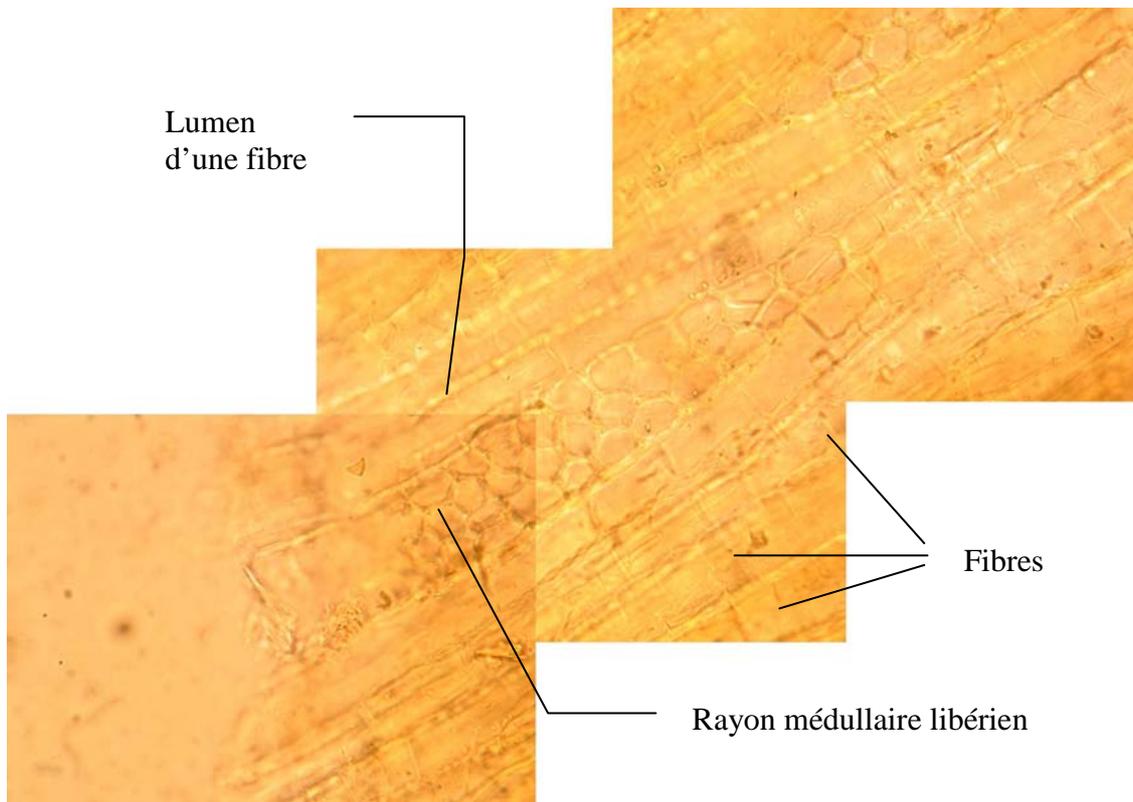
Le bois est léger, rosé, lustré, souvent ponctué par l'exsudation des canaux à résine. Les vaisseaux sont de taille moyenne, entourés de quelques cellules parenchymateuses non visibles à la loupe. Les rayons sont groupés par 2, voir 3, 4, relativement homogènes avec quelques rangées de cellules quadrangulaires aux extrémités ainsi que des canaux sécréteurs [Watson, 1992 ; Wendt, 1995 ; Mori, 1997].

#### **1.4. Anatomie de la poudre d'écorce**

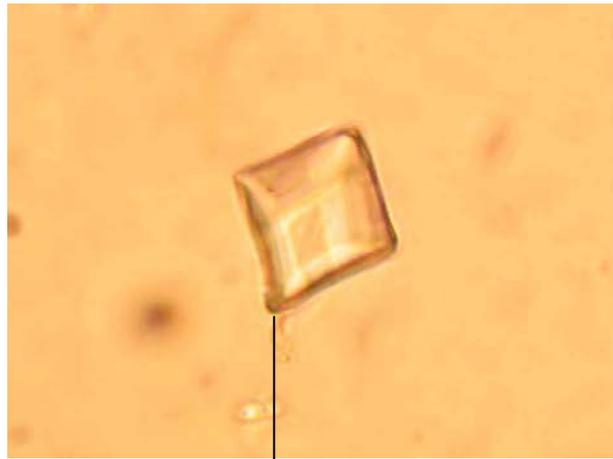
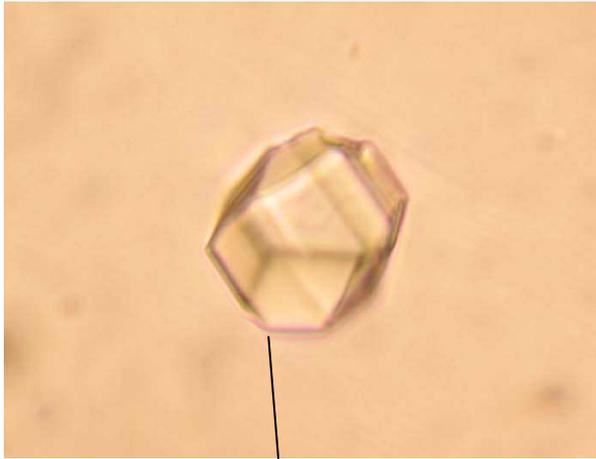
Une faible quantité de poudre est déposée sur une lame de microscope en présence de réactif lactique (**X<sup>ème</sup> Pharmacopée française**) puis recouverte d'une lamelle et chauffée.

Les éléments majeurs caractérisant la poudre d'écorce de *Tapirira guyanensis* sont :

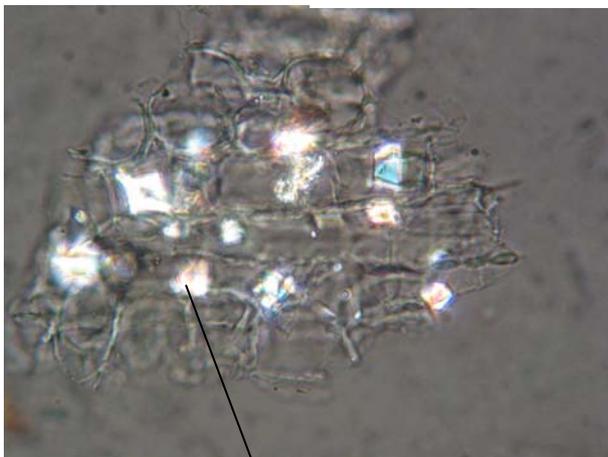
- suber et fibres (Figure 74 ; Figure 76 et Figure 77)
- présence en grande quantité de cristaux prismatiques d'oxalate de calcium (nettement visible avant chauffage et en lumière polarisée) (Figure 75)
- cellules scléreuses parfois en amas



**Figure 74 : Fragment d'écorce (fibres et liber) (G : x 400)**



Cristaux prismatiques d'oxalate de calcium (G x 1000)



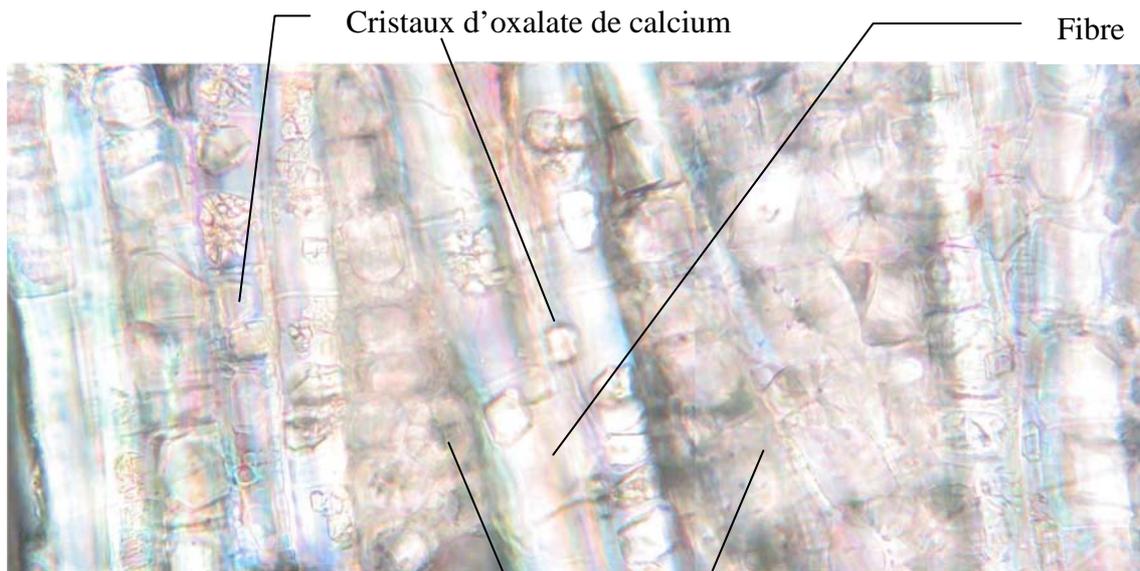
Lumière polarisée (G : x 400)



Lumière normale (G : x 400)

Cristaux inclus dans des  
cellules parenchymateuses

**Figure 75 : Cristaux prismatiques d'oxalate de calcium présents dans la poudre d'écorce (non chauffée) de *T. guianensis***



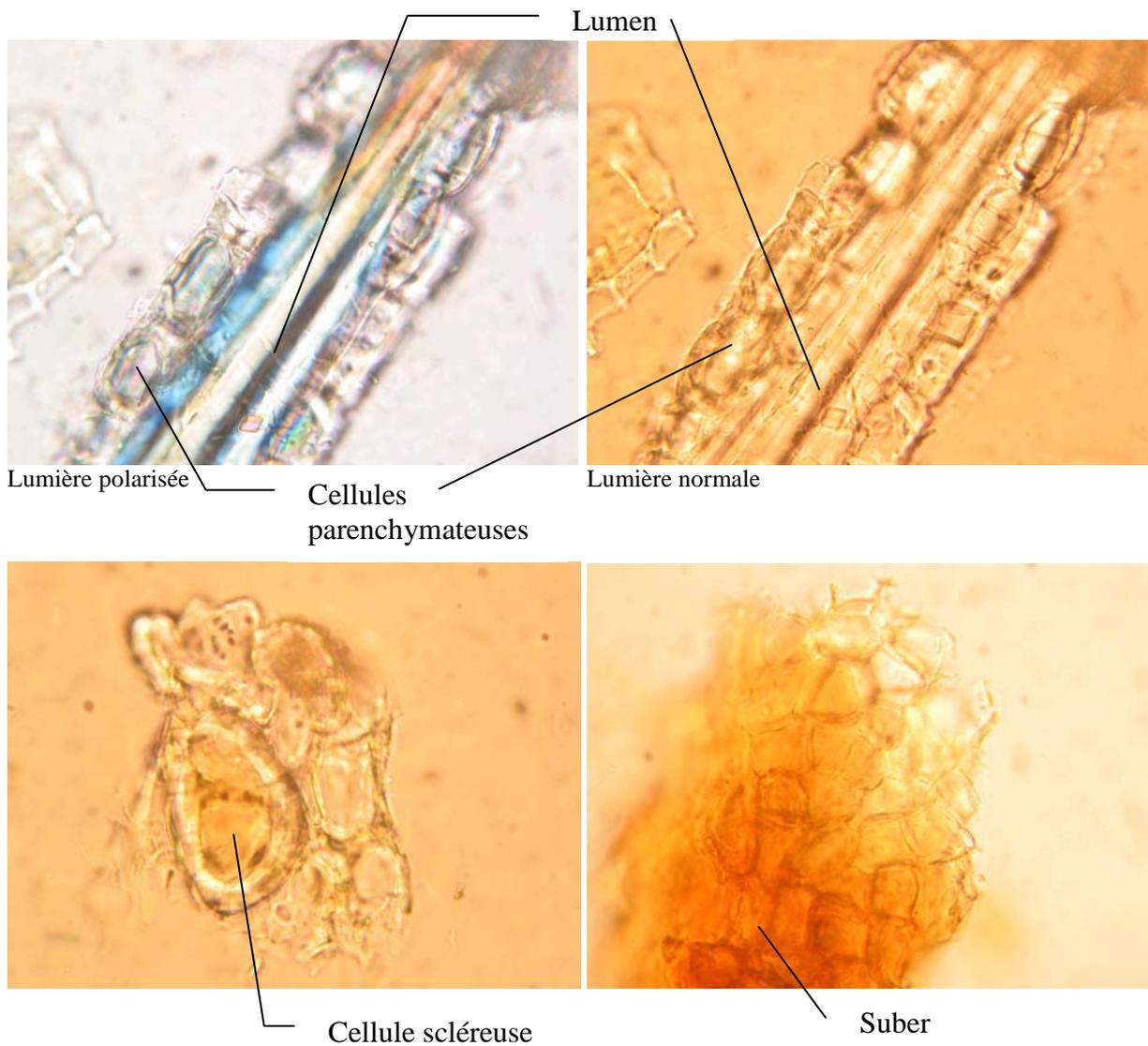
Observation en lumière polarisée



Observation en lumière normale

Cristal d'oxalate de calcium

**Figure 76 : Fragment d'écorce (fibres et cellules scléreuses) (G : x 400)**



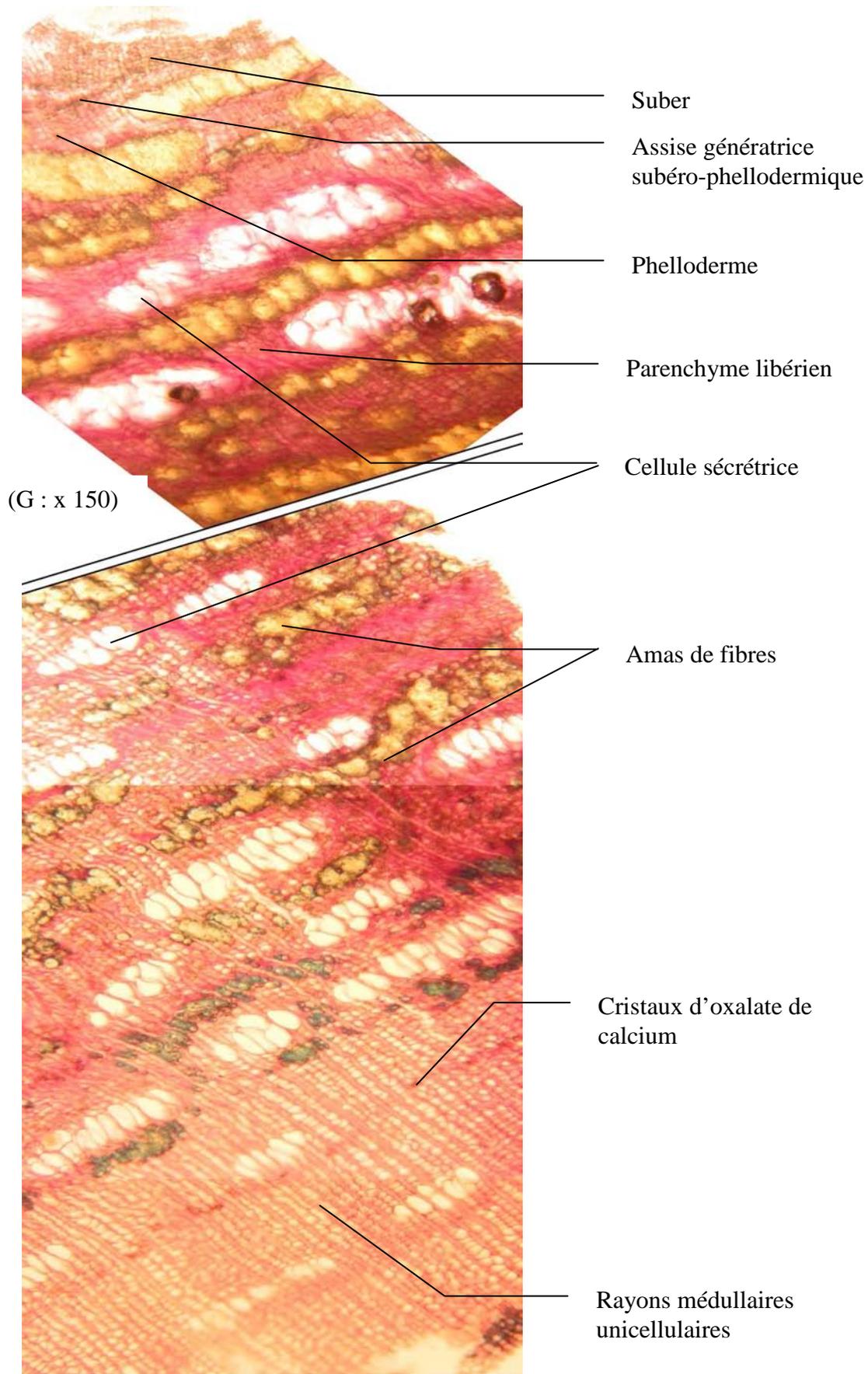
**Figure 77 : Principaux éléments de la poudre d'écorce de *T. guianensis* (G : x 400)**

### **1.5. Anatomie d'une section transversale d'écorce**

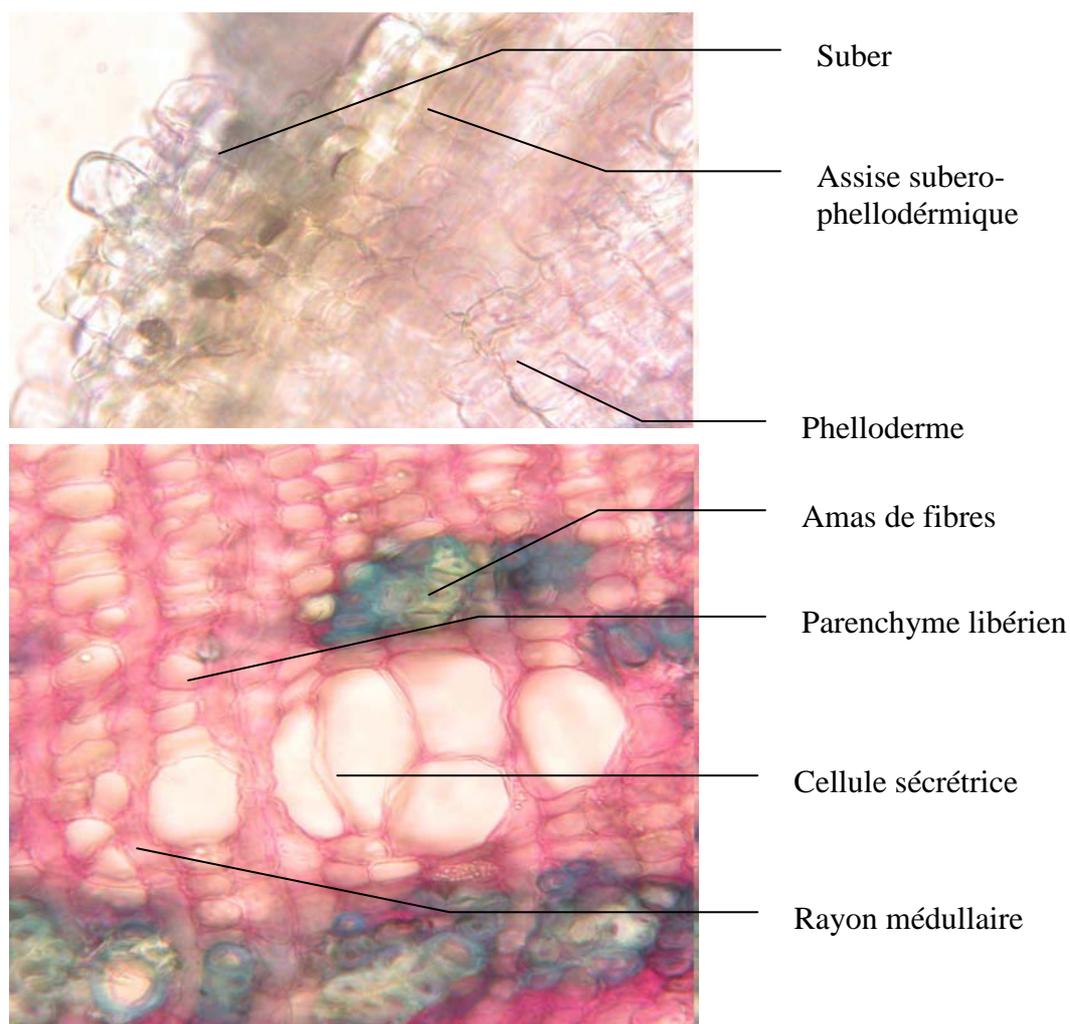
L'écorce est trempée dans l'eau pendant quelques heures puis débitée en fines lamelles placées dans une solution d'hypochlorite de Na (10%) puis rincées, immergées quelques minutes dans du colorant carmino vert (**X<sup>ème</sup> Pharmacopée française**) et à nouveau rincée.

Nous observons de l'extérieur vers l'intérieur les éléments suivants (Figure 78) :

- le suber
- l'assise génératrice subéro-phellodermique
- le phelloderme
- le parenchyme libérien interrompu d'amas de fibres alignés, de larges éléments sécréteurs regroupés et de cellules scléreuses
- des cristaux prismatiques d'oxalate de calcium en quantité importante
- des rayons médullaires unicellulaires



**Figure 78 : Section transversale de l'écorce de *T. guianensis* (G : x 100)**



**Figure 79 : Détails de l'écorce de *T. guianensis* (G : x 400)**

## **1.6. Utilisations traditionnelles**

*Tapirira guianensis* est utilisée en médecine traditionnelle dans de nombreuses populations d'Amérique du Sud, tout particulièrement en Guyane et en Bolivie. La majorité des applications thérapeutiques concerne un usage anti-infectieux [Barros, 1970 ; Franca, 1996]. L'utilisation de cette espèce (dans la pharmacopée guyanaise) est très proche de celle d'autres Anacardiaceae comme le Cajou (*Anacardium occidentale* L.) [Grenand, 1987]. L'écorce est employée sous forme de macérât froid ou de décoction contre les diarrhées et les vomissements. Cette décoction est également utilisée en bain de bouche hémostatique (après une extraction dentaire) ou, en application locale après un accouchement, afin d'éviter les hémorragies et les infections vaginales [Rodrigues, 2001].

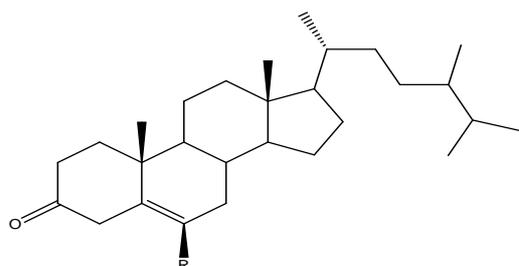
L'écorce finement râpée et pressée fournit un jus utilisé en gargarisme contre le muguet des jeunes enfants (candidose buccale bénigne). Cette drogue est également utilisée par les indiens Tacana de Bolivie contre le paludisme [Deharo, 2001].

Le bois se travaille facilement, se polit bien et peut être déroulé. Il est toutefois périssable et doit être traité [Goncalvez, 2003].

## 2. Description phytochimique du genre *Tapirira*

Seules deux espèces du genre *Tapirira* (*T. guianensis* ou *T. obtusa*) ont déjà fait l'objet d'études, les composés isolés appartiennent à différentes familles :

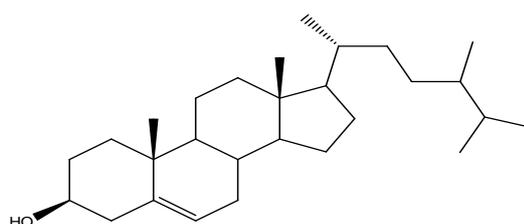
### 2.1. Les triterpènes [Correia, 2003]



R=H : Estigmast-4-én-3-one (M = 412)

R=OH : Estigmast-4-én-6β-ol-3-one (428)

Ecorce de *T. guianensis*

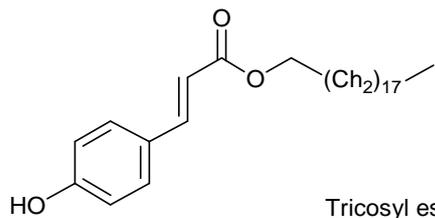


R=H : β-sitostérol (M = 414)

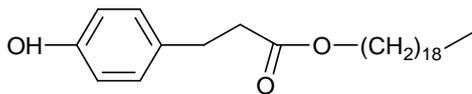
R=Glu : 3β-O-β-D-glucopyranosyl-sitostérol

Ecorce de *T. guianensis*

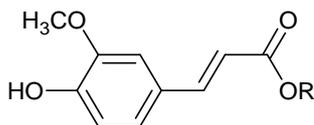
## 2.2. Les alkyl férulates



Tricosyl ester (M = 486) Ecorce de *T. guianensis*

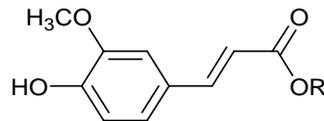


*p*-coumaroate de nonadécyl (M = 430) Ecorce de *T. guianensis*



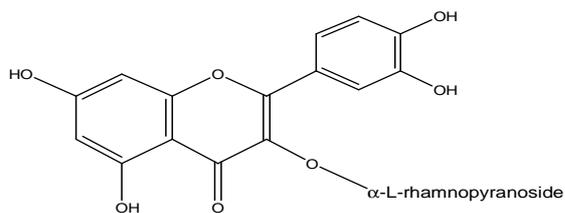
R = H: Ac. férulique (M = 194)  
R = Chaînes alkyl: Esters de ferulate  
avec des chaînes de 20 à 28  
carbones, paires

Ecorce de *T. guianensis*



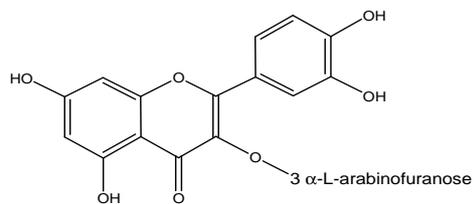
R = H: Ac. férulique (M = 197)  
R = Chaînes alkyl: Esters de ferulate  
avec des chaînes de 20 à 28 carbones  
paires

## 2.3. Les flavonoïdes [Compagnone, 1997]

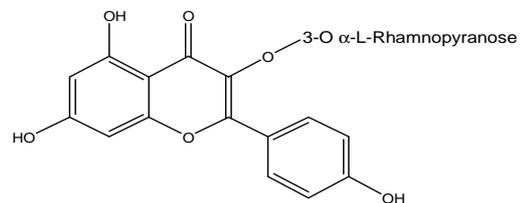


Quercitrine (M = 448)

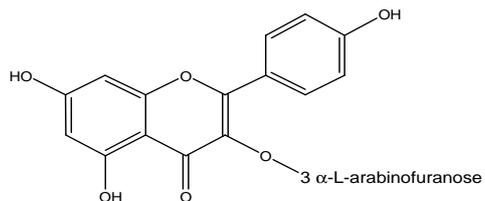
Ecorce de *T. guianensis*



Avicularine (M = 432)



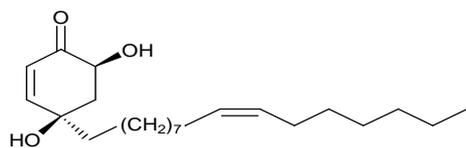
Afzeline (M = 432)



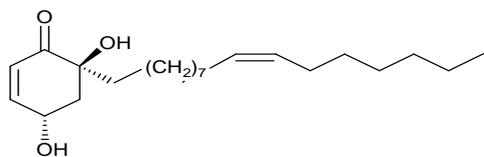
Ecorce de *T. guianensis*

Juglanine (M = 418)

## 2.4. Les cyclohexénones [David, 1998]



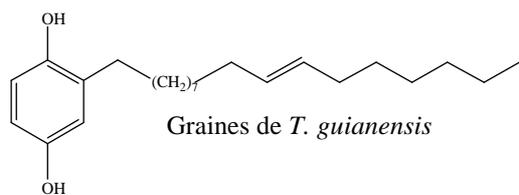
4, 6 - dihydroxy-4-[10'(Z)-heptadecényl] cyclohexénone (M = 364)



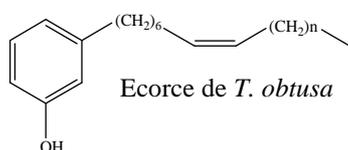
4, 6 - dihydroxy-6-[10'(Z)-heptadecényl] cyclohexénone (M = 364)

Ecorce de *T. obtusa*

## 2.5. Les alkyl-phénols [Correia, 2001]

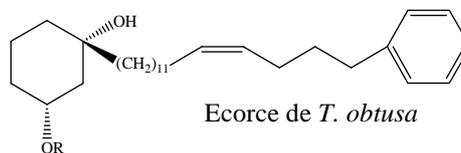


2-Heptadecényl-1,4-benzénediol 10',11'-didehydro (*E*) (M=346)



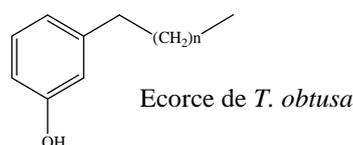
n = 10 : 1-hydroxy-3-[(*Z*)-7'-nonadécényl]benzène (M = 358)

n = 8 : 1-hydroxy-3-[(*Z*)-7'-heptadécényl]benzène (M = 330)



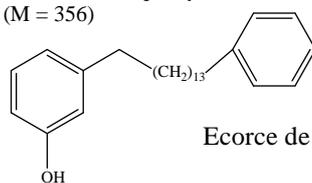
R = H : 1-(16'-phényl-12' *Z*-hécadécényl)-4-cyclohexène-(1*S*, 3*S*)-diol (M = 314)

R = Ac : 3-(16'-phényl-12' *Z*-hécadécényl)-3*S*-acétyl-4-cyclohexène-1*S*-ol (M = 356)



n = 15 : 1-hydroxy-3-heptadécénylbenzène (M = 332)

n = 13 : 1-hydroxy-3-pentadécénylbenzène (M = 304)



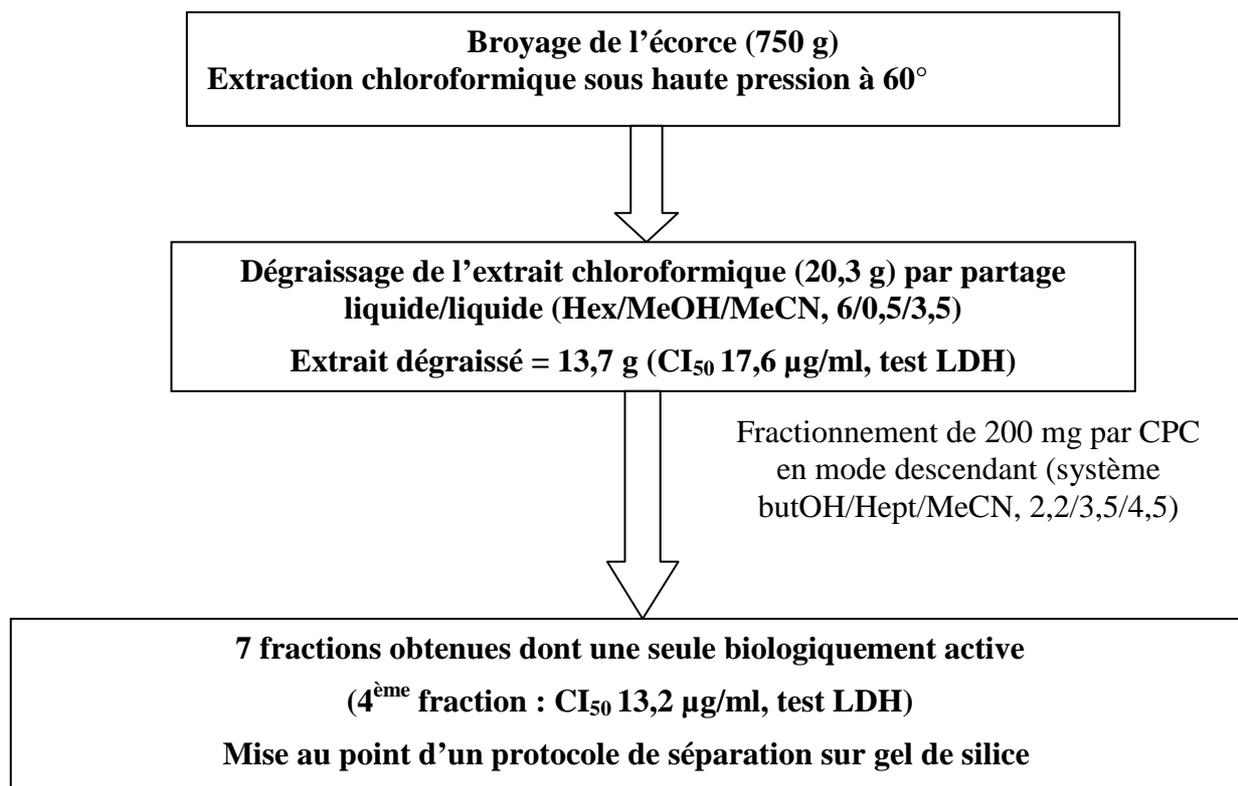
n = 13 : 1-hydroxy-3-[14'-phényltétradécyl]benzène (M = 366)

n = 11 : 1-hydroxy-3-[14'-phényldodécyl]benzène (M = 338)

## 3. Extractions bioguidées réalisées sur *T. guianensis*

### 3.1. Première série d'extraction

Nous avons tout d'abord réalisé la sélection des lots de drogues les plus actifs contre *P. falciparum* parmi une dizaine d'extraits chloroformiques ( $20 < CI_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ , test LDH). Les lots de récolte : GB 2853 et GB 3051, les plus actifs *in vitro* sur *P. falciparum* ont été broyés, puis traités au chloroforme. L'extrait obtenu a été dégraissé puis fractionné par chromatographie de partage centrifuge, menant à l'obtention de 7 fractions dont une active (la quatrième :  $CI_{50} 13,2 \mu\text{g/ml}$ , test LDH). Nous avons alors élaboré un protocole de séparation adapté sur une plus grande quantité de drogue et ciblé sur la fraction la plus active dont nous connaissions dès lors la polarité et la « consistance ». La première série d'extraction détaillée ci-dessous (Figure 80) a donc permis de localiser l'activité antiplasmodiale au sein des différentes fractions obtenues, et d'en établir un profil par chromatographie sur couche mince et révélation à la vanilline sulfurique.



**Figure 80 : Schéma simplifié de la première série d'extraction réalisée sur l'écorce de *T. guianensis***

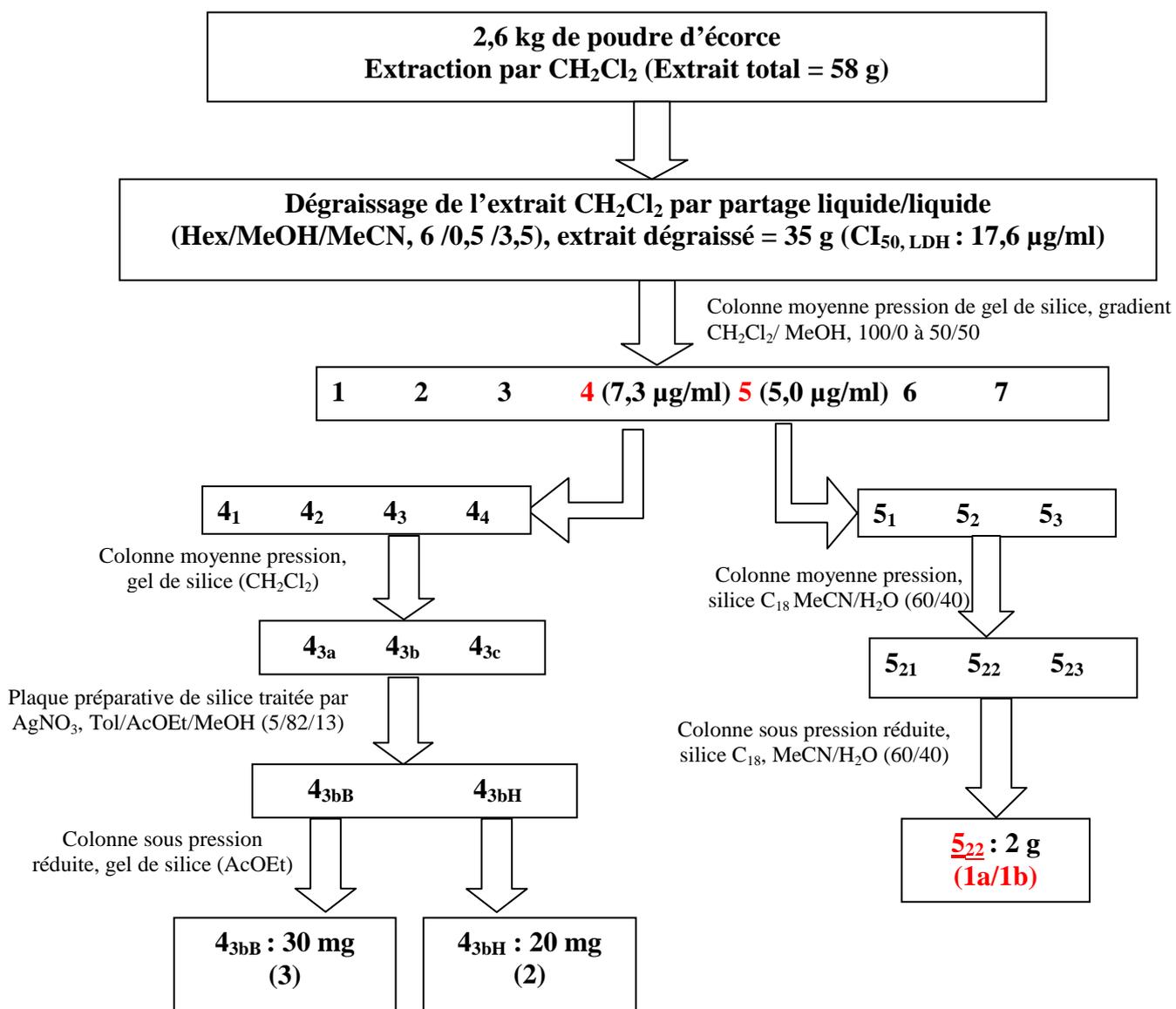
### **3.2. Deuxième série d'extraction**

L'écorce finement broyée (à l'aide d'un broyeur à marteaux munis d'un tamis de diamètre de pores = 0,2 mm), est traitée au dichlorométhane (équivalent à l'extraction chloroformique de la première série d'extraction). L'extrait obtenu (renfermant l'activité antiplasmodiale la plus importante par rapport à des extraits méthanolique ou hexanique) est alors dégraissé par partage liquide-liquide (3 fois), puis fractionné par chromatographie sur gel silice. Nous avons ainsi obtenue 7 fractions dont 2 actives (4 :  $CI_{50} = 7,3 \mu\text{g/ml}$  et 5  $CI_{50} = 5,0 \mu\text{g/ml}$  par détection à l'hypoxanthine tritiée).

La fraction 4 a été successivement traitée par colonnes moyenne pression de gel de silice puis par chromatographie sur plaque préparative de gel de silice traitée au nitrate d'argent. Ces différentes chromatographies ont mené à l'obtention de 2 fractions ( $4_{3bB}$  et  $4_{3bH}$ ) alors purifiées par chromatographie moyenne pression sur gel de silice, permettant la séparation de deux composés minoritaires et non actif : **2** et **3**.

La fraction 5 a été purifiée par une série de chromatographies (moyenne pression et pression réduite) de gel de silice greffée en C<sub>18</sub> qui a permis l'obtention de la fraction 5<sub>22</sub> en grande quantité (2 g).

Ce fractionnement a été bioguidé par mesure de l'activité *in vitro* sur *P. falciparum*, détection à l'hypoxanthine tritiée (Figure 81).



**Figure 81 : Schéma simplifié de la seconde série d'extraction réalisée sur l'écorce de *T. guianensis***

Ce schéma d'extraction est simplifié et ne représente pas les étapes de purifications répétées successivement avec les mêmes protocoles, ni les séparations peu efficaces (CLHP et colonnes de silice ne permettant pas la séparation de 4<sub>3bB</sub> et 4<sub>3bH</sub>).

Les masses initiales d'extrait sont souvent importantes, garantissant l'obtention finale de composés purs en quantités suffisantes pour effectuer les tests biologiques et les analyses structurales. Le suivi des purifications est réalisé par chromatographie sur couche mince (silice parfois traitée au nitrate d'argent) et révélée à la vanilline sulfurique. La nature huileuse de ces composés empêche une cristallisation à température ambiante, le seul moyen d'identification a donc été la RMN (l'absence de cristaux rendant impossible l'identification des structures par radiocristallographie).

Les expériences de RMN ont été réalisées dans le  $\text{CDCl}_3$  ou le  $\text{CD}_3\text{OD}$  et le  $\text{DMSO-}d_6$  afin de localiser les fonctions hydroxyles dans le dernier cas et d'obtenir un maximum de valeurs de constantes de couplages avec les deux autres solvants.

#### **4. Identification des composés isolés de *Tapirira guianensis***

Les quatre molécules isolées de l'écorce de *T. guianensis* sont issues de fractions sélectionnées pour leurs activités *in vitro* contre *P. falciparum*. L'analyse structurale de ces composés est principalement basée sur l'étude des spectres de RMN, réalisés dans le  $\text{DMSO-}d_6$ , puis confirmée dans d'autres solvants ( $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). La détermination des configurations relatives de ces composés demeure hypothétique en raison de la superposition des signaux et de l'existence de conformères ne permettant pas de déduire toutes les constantes de couplages nécessaires. Par ailleurs, nous avons valorisé ces molécules par la mise en évidence d'activités biologiques antiplasmodiale, leishmanicide ou bactéricide, mais aussi par l'identification de leurs structures jusqu'ici inconnues dans le règne végétal.

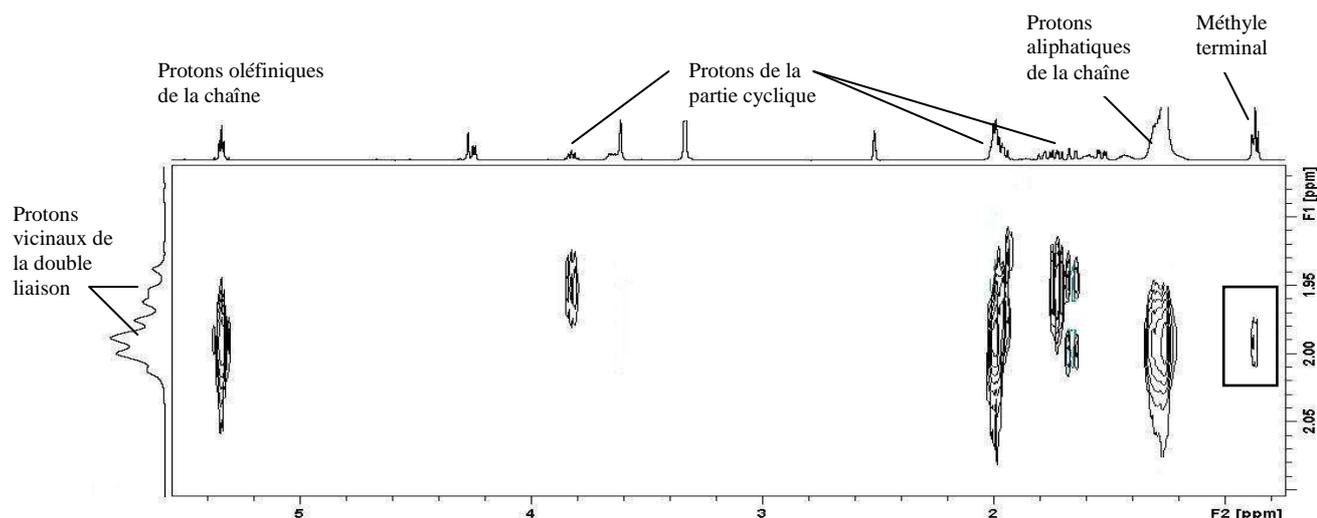
## 4.1. Partie structurale commune aux quatre molécules isolées

Chacun des composés isolés comporte une partie cyclique poly-hydroxylée à 6 carbones et une chaîne mono-insaturée de 17 carbones. Ces structures amphiphiles ont en commun leurs chaînes carbonées. En effet, l'analyse du spectre de RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$  ou autres solvants) témoigne de l'existence de deux groupes de signaux identiques pour les quatre composés isolés. Il s'agit d'une part d'une zone aliphatique constituée des signaux d'un méthyle terminal (sous forme d'un triplet à  $\delta_{\text{H}}$  : 0,86 à 0,91 ppm,  $J = 7,0$  ou  $7,1$  Hz) ainsi que d'un massif d'une vingtaine de protons aliphatiques (multiplet de  $\delta_{\text{H}}$  : 1,20 à 1,36 ppm) et d'autre part, de quatre autres protons aliphatiques (plus déblindés, sous forme de multiplet à  $\delta_{\text{H}} \approx 1,98$  ppm) répartis de part et d'autre d'une double liaison (2 protons formant un multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  : 5,32 à 5,34 ppm).

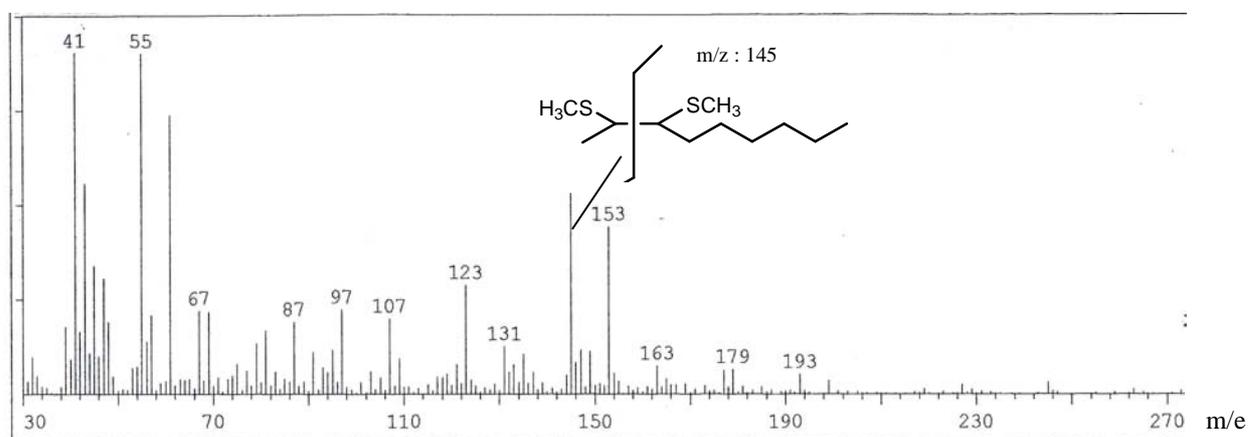
L'analyse des spectres de RMN- $^{13}\text{C}$  réalisés en *J mod* (500 MHz, DMSO- $d_6$  ou autres solvants) révèle également la présence de carbones aliphatiques entre 14 et 47 ppm ainsi que d'un pic, intégrant pour deux carbones oléfiniques équivalents, à  $\delta_{\text{C}} \approx 130$  ppm.

Les analyses RMN bidimensionnelles réalisées en TOCSY (corrélations protons-protons plus étendues) démontrent une corrélation des protons en  $\alpha$  de la double liaison (multiplet à  $\approx 1,98$  ppm) avec le méthyle terminal, prouvant la relative proximité de ces deux groupes, mais ne permettant pas de situer l'insaturation sur la chaîne aliphatique (Figure 82). La thiométhylation des doubles liaisons de ces composés suivie de leurs fragmentations en spectrométrie de masse (par impact électronique) a donc été nécessaire [Mansour, 2005]. En effet, l'addition de deux groupements thyométhylés sur une double liaison fragilise cette dernière qui se fragmente alors plus facilement en impact électronique. Cette analyse a permis la mise en évidence d'un fragment abondant et commun à tous les composés de  $m/z = 145$  correspondant très probablement à la formule :  $(\text{CH}_3)\text{SCH}^+(\text{CH}_2)_5\text{-CH}_3$  de la partie terminale de la chaîne. La présence de ce fragment permet de situer la double liaison (7<sup>ème</sup> carbone à partir du méthyle terminal).

La configuration « cis » de cette insaturation ne peut pas être déterminée par mesure de la constante de couplage des protons oléfiniques car les signaux sont de second ordre. Néanmoins, cette configuration « cis » est prouvée par comparaison des déplacements chimiques des carbones oléfiniques ( $\delta_{\text{C}}$  : 129,6 à 131,5 ppm) et vicinaux ( $\delta_{\text{C}}$  : 26,6 à 27,1 ppm), identiques à ceux décrits dans d'autres publications au sujet du même type de composé [Groweiss, 1997 ; Queiroz, 2003 ; Hoarau, 2006] ou de lipides [Lie Ken Jie, 1997], préalablement démontrés par de nombreuses autres équipes .



**Figure 82 : Spectre TOCSY des protons aliphatiques en  $\alpha$  de la double liaison de la chaîne (500 MHz, DMSO *d*<sub>6</sub>, composé 3)**



**Figure 83 : Spectre de masse (impact électronique) des dérivés thiométhylés des composés 1a et 1b**

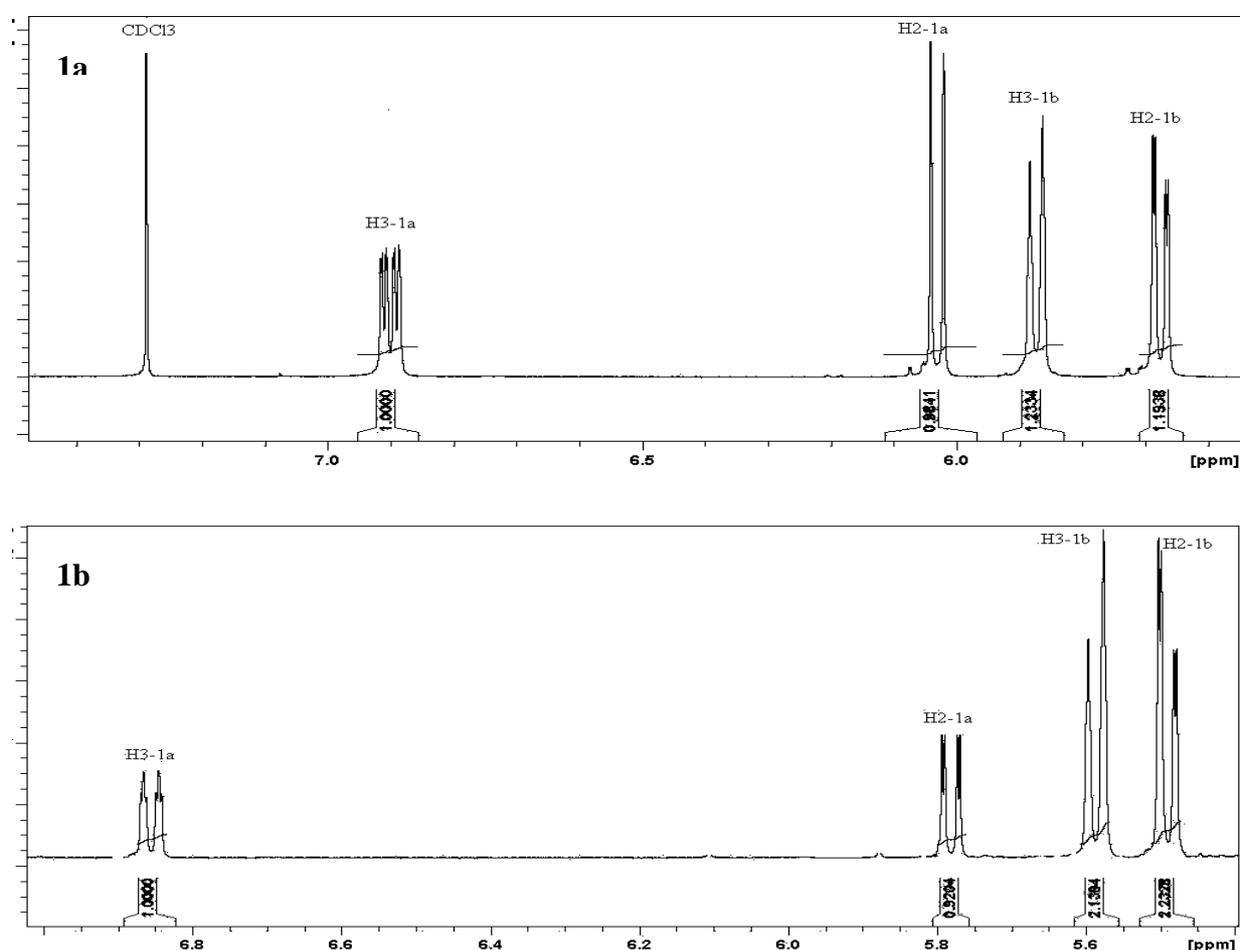
## 4.2. Identification des composés 1a et 1b

Les différentes techniques analytiques de chromatographie : CCM en phase normale et CLHP en phase inverse utilisant de nombreux types de protocoles de migration et de révélation n'ont pas permis la séparation de 1a avec 1b. Ce mélange de deux molécules difficilement séparables se présente sous la forme d'un corps gras opaque.

Le spectre infrarouge (sur KBr) de ce mélange met en évidence la présence de fonctions OH (large bande d'absorption à  $3373\text{ cm}^{-1}$ ), carbonyle ( $2925, 2854, 2925, 2854, 1681\text{ cm}^{-1}$ ), alcènes ( $3005\text{ cm}^{-1}$ ), et alcanes ( $1465\text{ cm}^{-1}$ ). Le spectre ultraviolet (dans le chloroforme) montre une forte absorption à  $244\text{ nm}$  ( $\log \epsilon : 2,66$ ) caractérisant une fonction cétone  $\alpha, \beta$ -

insaturée. Le pouvoir rotatoire du mélange  $[\alpha]_D^{25} = + 22,8^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c : 2,0$ ), non nul montre la chiralité du mélange. Les analyses en spectrométrie de masse haute résolution de type HR-ESI-Q-TOF-MS révèlent un ion quasi-moléculaire de  $m/z = 381,302$  ( $M+H^+$ ) précise à 4 ppm, permettant de déduire la formule brute commune des 2 molécules :  $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_4$ .

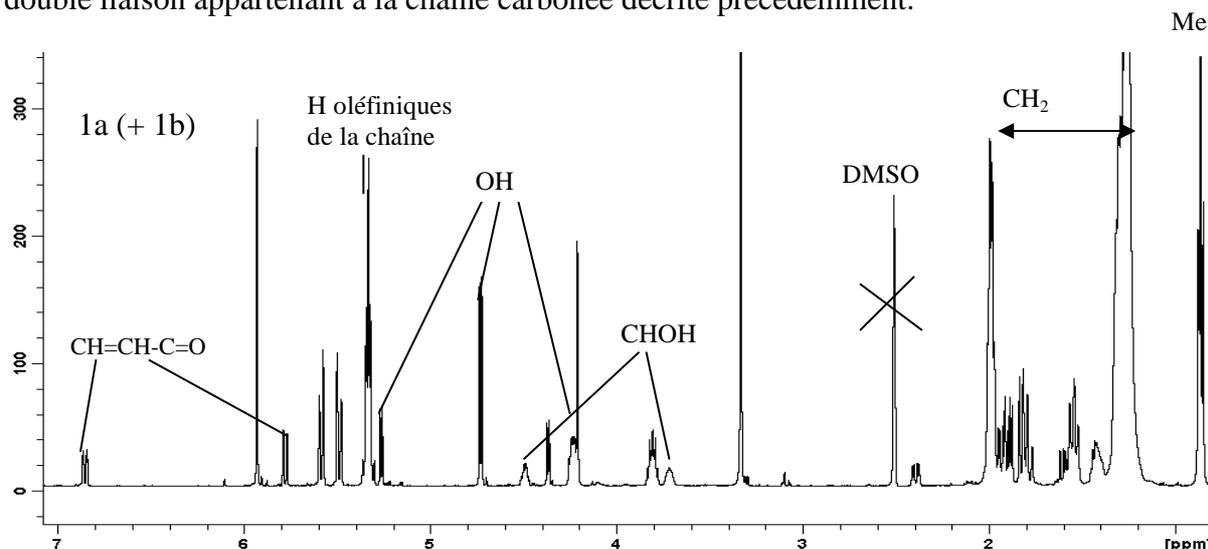
L'analyse des spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$  ;  $^{13}\text{C}$ ) montre deux groupes de signaux juxtaposés dans des proportions variables suivant le solvant deutéré utilisé, ce qui indique la présence de deux formes en équilibre : 1a et 1b ( $1a/1b = 1/2$  dans le  $\text{DMSO-}d_6$  et  $1a/1b = 1/1$  dans le  $\text{CDCl}_3$ ). Cette hypothèse est également vérifiée lorsque les analyses RMN sont réalisées à différentes températures, nous constatons alors une variation des proportions des deux composés.



**Figure 84 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  comparés dans  $\text{CDCl}_3$  (a) et dans  $\text{DMSO-}d_6$  (b)**

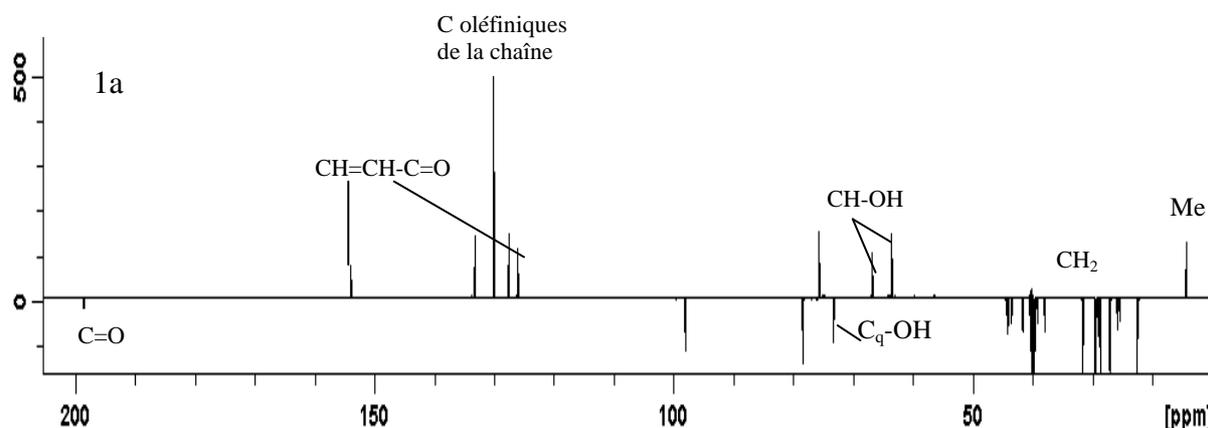
Les différences d'intensité des signaux sur les spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$  ;  $^{13}\text{C}$ ) dans le  $\text{DMSO-}d_6$  permettent de distinguer les signaux des deux molécules et révèlent, pour **1a**, la présence de deux protons oléfiniques vicinaux :  $\delta_{\text{H}} : 5,78$  ppm ( $d$  ;  $J_{\text{ortho}} = 10,2$  Hz,  $J_{\text{meta}} = 1,7$  Hz) et  $\delta_{\text{H}} : 6,85$  ppm ( $dt$  ;  $J_{\text{ortho}} = 10,2$  Hz,  $J = 1,7$  Hz) ainsi que la présence de protons non aromatiques fortement déblindés correspondant à des fonctions OH ( $\delta_{\text{H}} : 4,37, 4,73$  et  $5,35$

ppm), et à des protons portés par les carbones hydroxylés ( $\delta_H$  : 3,72, 4,49 ppm). Le reste du spectre est constitué de nombreux protons aliphatiques disposés en massifs ainsi que d'une double liaison appartenant à la chaîne carbonée décrite précédemment.



**Figure 85 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  dans le DMSO- $d_6$  (500 MHz) des composés 1a 1b**

L'analyse du spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  réalisé en *J mod* (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) indique la présence d'une cétone conjuguée de déplacement chimique caractéristique ( $\delta_C$  : 198,7 ppm) ainsi que de deux carbones oléfiniques en position  $\alpha$  et  $\beta$  de la fonction cétone ( $\delta_C$  : 126,1 et 153,9 ppm) (Figure 86). Deux autres signaux d'intensité moindre sont également identifiables, il s'agit d'un C quaternaire à  $\delta_C$  : 73,4 et d'un CH à 66,8 ppm, faisant partie des trois carbones hydroxylés. Le reste des signaux présents sur le spectre appartient majoritairement à la chaîne aliphatique mono-insaturée ou à l'autre composé en mélange (**1b**).



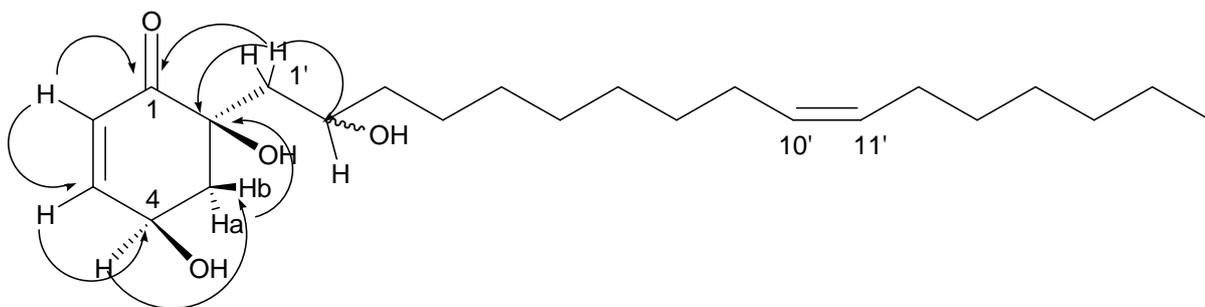
**Figure 86 : Spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  réalisé en *J mod* (500 MHz, DMSO- $d_6$ )**

Les corrélations observées sur le spectre 2D HSQC (DMSO- $d_6$ ) permettent d'attribuer à chacun des carbones de la chaîne carbonée les protons qui les substituent et de distinguer le signal de l'insaturation présent sur cette chaîne ( $\delta_C$  : 130,1 ppm,  $\delta_H$  : 5,34 ppm, *m*) commun

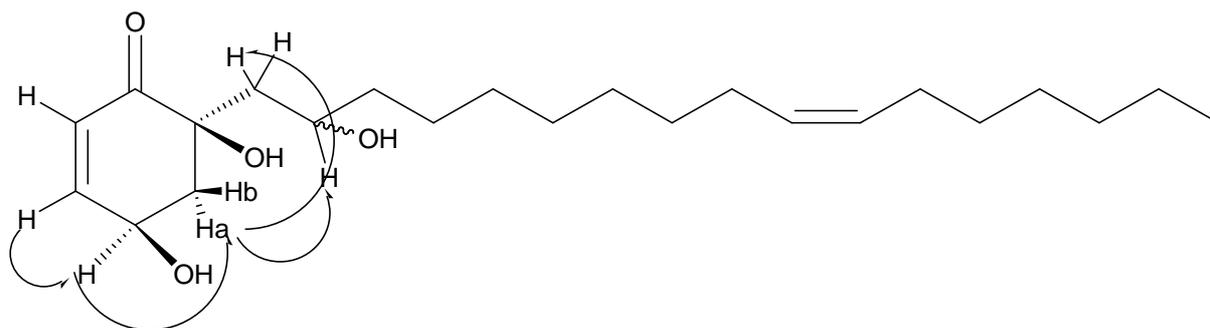
aux deux composés (**1a** et **1b**). Nous observons également les signaux d'une autre insaturation ( $\delta_C$  : 126,1 et 153,9 ppm corrélant aux protons oléfiniques :  $\delta_H$  : 5,78 et 6,85 ppm)

Les corrélations observées sur le spectre 2D HMBC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) permettent d'attribuer à chacune des trois fonctions OH ( $\delta_H$  : 4,37, 4,73 et 5,35 ppm) les carbones qui les portent ( $\delta_C$  : 66,8, 63,7 et 73,4 ppm) et de déduire l'enchaînement des atomes de carbones constituant la partie cyclique de la molécule. En effet, le proton oléfinique ( $\delta_H$  : 6,85 ppm) positionné en  $\beta$  de la cétone ( $\delta_C$  : 198,7 ppm) corrèle non seulement avec cette dernière mais aussi avec un CH hydroxylé ( $\delta_C$  : 63,7 ppm, C<sub>4</sub>) et un CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  : 44,0 ppm, C<sub>5</sub>,  $\delta_H$  : 1,80 et 2,39 ppm). La corrélation de ces deux derniers protons (H-5) avec le carbone quaternaire hydroxylé ( $\delta_C$  : 73,4 ppm, C<sub>6</sub>) ainsi qu'avec la cétone à  $\delta_C$  : 198,7 ppm (C<sub>1</sub>), permet d'identifier un cycle hexénone, et de mettre en évidence le point de liaison de ce cycle avec la chaîne aliphatique (hydroxylé en 2') au niveau du carbone quaternaire C<sub>6</sub>. le composé **1a** est donc la 2',4,6-trihydroxy-6-[10'(Z)-heptadécényl]-2-cyclohexénone, structure identifiée pour la première fois dans le règne végétal.

La structure relative de cette molécule, n'a pu être totalement définie à l'aide des constantes de couplages, difficilement évaluables en raison de la superposition des signaux (quel que soit le solvant deutéré utilisé). Nous avons donc poursuivi le reste de l'identification par l'analyse du spectre NOESY réalisé dans le CDCl<sub>3</sub>. L'analyse de ce spectre indique des corrélations dans l'espace du proton H-4 à 4,59 ppm avec son voisin oléfinique H-3 ( $\delta_H$  : 6,86 ppm) d'une part, et avec un seul des deux protons portés par C<sub>5</sub> ( $\delta_{Ha}$  : 2,24 ppm) d'autre part. Ce même proton H<sub>a</sub>-5 étant le seul des 2 H-5 à corrélérer avec les deux protons H-1' de la chaîne aliphatique, il apparaît que cette chaîne ainsi que H<sub>a</sub>-5 et H-4 sont positionnés du même côté du plan défini par la cyclohexénone. Cette hypothèse est confirmée par la constante de couplage  $J_{ax-eq} = 5,0$  Hz (dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>) de H<sub>b</sub>-5 ( $\delta_H$  : 2,39 ppm, *ddd*, 13,6, 5,0, 1,7 Hz) avec H-4 ( $\delta_H$  : 4,49 ppm). Concernant le carbone asymétrique CHOH en 2', la libre rotation de la chaîne aliphatique qui le porte, ainsi que la non-lisibilité des constantes de couplages de son proton H-2' (sous forme de multiplet quel que soit le solvant utilisé ou la température appliquée) ne permettent pas de déterminer sa configuration.



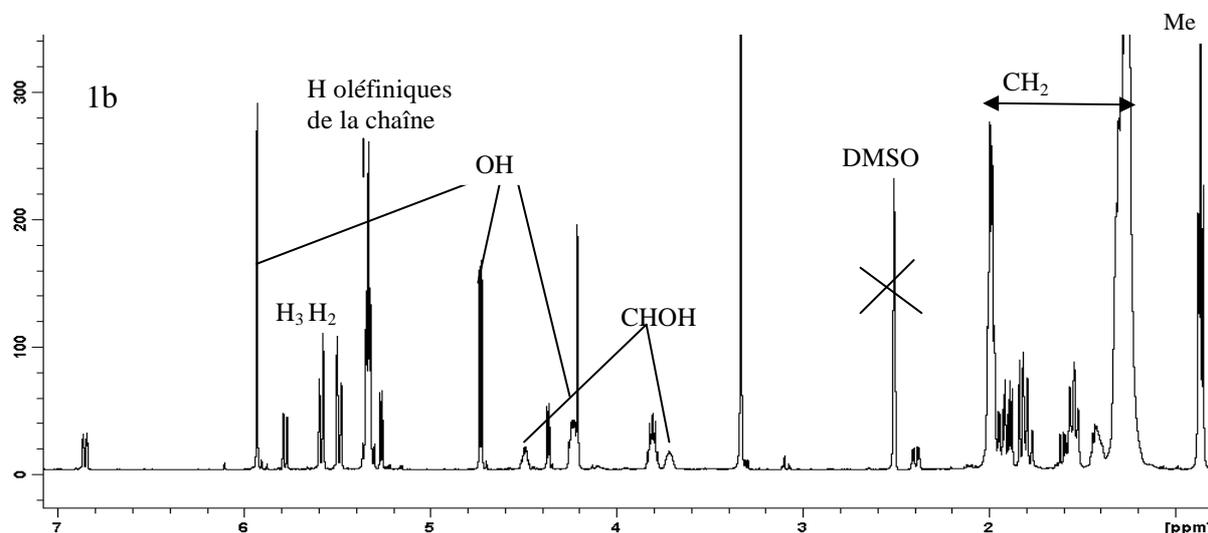
**Figure 87 :** Corrélations observées sur le spectre HMBC du composé **1a** (2',4,6-trihydroxy-6-[10'(Z)-heptadécényl]-2-cyclohexénone) (500 MHz, DMSO-*d*6).



**Figure 88 :** Corrélations observées sur le spectre NOESY du composé **1a** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

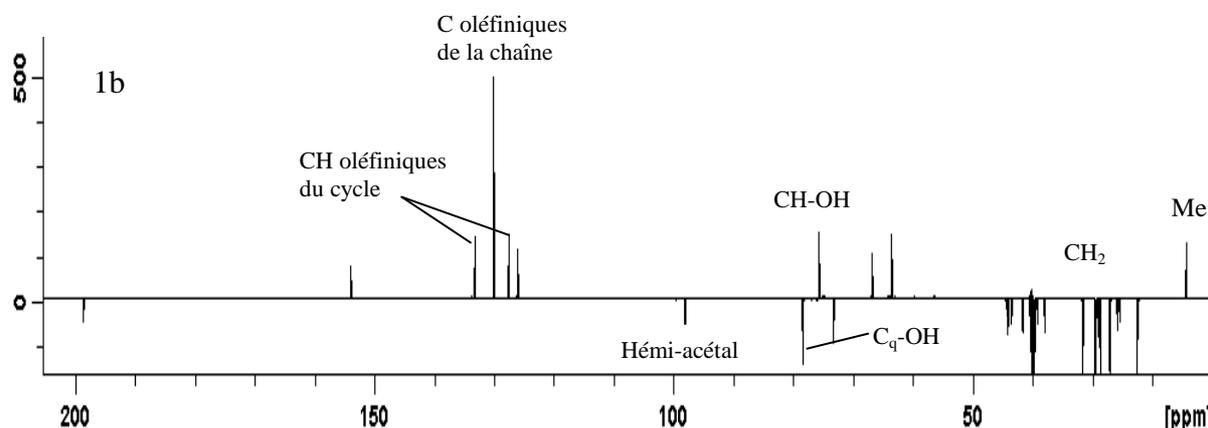
Le deuxième composé révélé par les spectres de RMN 1D (<sup>1</sup>H ; <sup>13</sup>C) possède des signaux deux fois plus intenses dans le DMSO-*d*6 que ceux de la molécule **1a**, ce qui permet de mieux les distinguer.

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz dans le DMSO-*d*6) du composé **1b** présente, dans la zone de faible champ, deux signaux correspondant à des protons oléfiniques vicinaux :  $\delta_{\text{H}}$  : 5,49 ppm (*d* ;  $J_{\text{vic}} = 10,2$  Hz,  $J_{\text{meta}} = 2,0$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  : 5,59 ppm (*dd* ;  $J_{\text{vic}} = 10,2$  Hz,  $J = 1,4$  Hz) ainsi que des protons non aromatiques fortement déblindés correspondant à des fonctions OH ( $\delta_{\text{H}}$  : 4,20 , 4,73 et 5,93 ppm) et au proton d'un CHOH ( $\delta_{\text{H}}$  : 4,23 ppm) (Figure 89). Le reste du spectre est constitué de nombreux protons aliphatiques disposés en massifs ainsi que des deux protons de la double liaison appartenant à la chaîne carbonée décrite précédemment (ou au composé **1a**), à l'exception de certains protons aliphatiques de signaux isolés ( $\delta_{\text{H}}$  : 1,55, 1,82, 1,89 ppm).



**Figure 89: Spectres RMN  $^1\text{H}$  dans le DMSO-*d*6 (500 MHz) des composés 1a 1b**

L'analyse du spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  réalisé en *J mod* (500 MHz, DMSO-*d*6) indique la présence de deux carbones quaternaires : l'un possède le déplacement chimique d'une fonction héli-acétal ( $\delta_{\text{C}}$  : 98,1 ppm) et l'autre, est un carbone quaternaire de jonction de cycle ( $\delta_{\text{C}}$  : 78,5 ppm) (Figure 90). Nous observons également les signaux de deux carbones oléfiniques, à  $\delta_{\text{C}}$  : 127,6 et 133,3 ppm ainsi que deux CH non aromatiques (hydroxylés) à  $\delta_{\text{C}}$  : 63,7 ppm et 75,8 ppm.

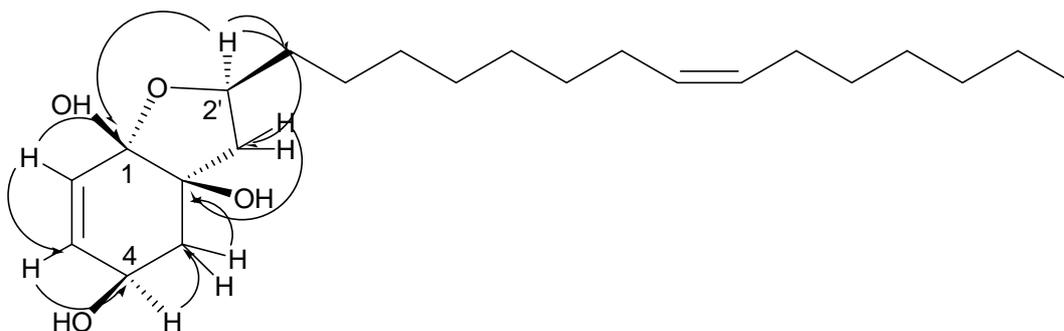


**Figure 90: Spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  réalisé en *J mod* (500 MHz, DMSO-*d*6) des composés 1a 1b**

Les corrélations observées sur le spectre 2D HSQC (DMSO-*d*6) permettent, en outre, d'attribuer à chacun des carbones de la chaîne carbonée les protons qui les substituent ainsi que de distinguer deux  $\text{CH}_2$ , de déplacements élevés ( $\delta_{\text{C}}$  : 41,8 et 44,3 ppm) n'appartenant pas à la chaîne mono-insaturée.

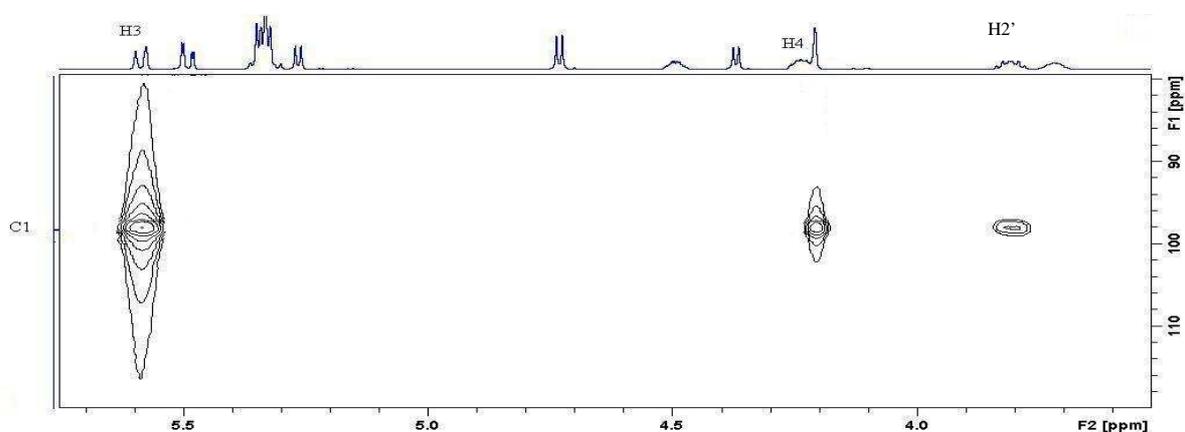
Le spectre HMBC (Figure 91), quant à lui, permet d'attribuer à chacune des trois fonctions OH ( $\delta_{\text{H}}$  : 4,20 , 4,73 et 5,93 ppm) le carbone qui la porte ( $\delta_{\text{C}}$  : 78,5, 63,7 et 98,1 ppm) et nous renseigne sur la position des différents groupes fonctionnels. En effet, nous observons la

corrélation des protons vicinaux oléfiniques ( $\delta_H$  : 5,49 et 5,59 ppm,  $J_{vic} = 10,2$  Hz) avec le carbone héli-acétalique ( $\delta_C$  : 98,1,  $C_1$  ppm) d'un coté et un CHOH ( $\delta_C$  : 63,7 ppm,  $C_4$ ) de l'autre coté. Le proton porté par ce dernier ( $\delta_H$  : 4,23 ppm) corrèle avec un  $CH_2$  ( $\delta_H$  : 41,8 ppm) et avec le carbone quaternaire de jonction de cycle décrit précédemment ( $\delta_C$  : 78,5 ppm,  $C_6$ ). Cette ensemble de 6 carbones compose un cycle hexénique substitué par trois fonctions OH (en position 1, 4 et 6).



**Figure 91 : Corrélations observées sur le spectre HMBC du composé 1b (500 MHz, DMSO- $d_6$ )**

Par ailleurs, la corrélation HMBC du carbone héli-acétalique ( $C_1$ ) avec le proton  $H_2$  ( $\delta_H$  : 3,80 ppm), et les corrélations de ce dernier avec le  $CH_2$  en 1' ( $\delta_C$  : 44,3 ppm) et avec le carbone de jonction de cycle  $C_6$  (78,5 ppm) mettent en évidence l'existence d'un cycle furanique accolé au cyclohexéne. Nous observons également de nombreuses corrélations du carbone en position 2' avec les signaux de la chaîne aliphatique ( $\delta_H$  compris entre 1,25 et 1,35 ppm) prouvant que ce carbone est le point de liaison de la chaîne aliphatique avec la partie cyclique de la molécule (Figure 92).

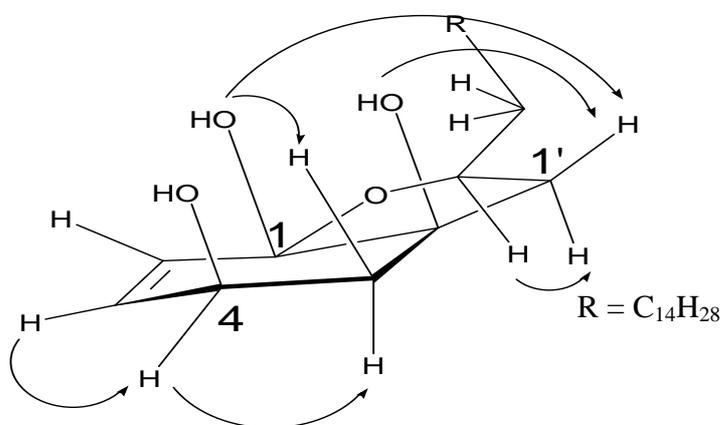


**Figure 92 : Corrélations HMBC (500MHz, DMSO- $d_6$ ) du carbone héli-acétalique  $C_1$  de 1b**

Le reste de la chaîne aliphatique mono-insaturée reste inchangé dans les deux cas (les signaux de ces deux molécules, **1a** et **1b**, étant confondus dans cette partie du spectre).

La détermination de la configuration relative du composé **1b** peut être indiquée par différentes analyses spectrales :

- la constante de couplage de H<sub>b</sub>-5 ( $J = 5,2$  Hz) caractérise une constante axiale-équatoriale par rapport à H-4
- les corrélations figurant sur le spectre NOESY dans CDCl<sub>3</sub> de H<sub>b</sub>-5 ( $\delta_H$  : 2,26 ppm) avec H-4 ( $\delta_H$  : 4,53 ppm) et H<sub>a</sub>-1' ( $\delta_H$  : 1,90 ppm), ainsi que H<sub>a</sub>-1' avec les protons aliphatiques en 3' ( $\delta_H$  : 1,50 et 1,66 ppm) permettent de positionner ces protons du même côté par rapport au squelette de la molécule
- les corrélations signalées par ce même spectre NOESY (CDCl<sub>3</sub>) entre H<sub>b</sub>-1' ( $\delta_H$  : 2,11 ppm) et H-2' ( $\delta_H$  : 3,99 ppm), qui seraient de l'autre côté du plan du cycle furanique par rapport aux protons cités précédemment
- enfin, si nous considérons les corrélations NOESY dans le DMSO-*d*<sub>6</sub> (bien que ce solvant interagisse fortement avec les fonctions oxygénées) entre les protons OH-1 ( $\delta_H$  : 5,93, intégrant pour 1 proton), H<sub>a</sub>-5 ( $\delta_H$  : 1,55 ppm) H<sub>a</sub>-1' ( $\delta_H$  : 1,82 ppm) et H-3' ( $\delta_H$  : 1,42 et 1,55 ppm) d'une part et de OH-6 ( $\delta_H$  : 4,20, intégrant pour 1 proton) avec H<sub>a</sub>-1' ( $\delta_H$  : 1,82 ppm), nous pouvons déduire que la chaîne aliphatique et OH-1 ainsi que H<sub>a</sub>-5 et OH-6 sont orientés vers le même côté du cycle furanique. Cette hypothèse est confirmée par la corrélation de H<sub>b</sub>-1' ( $\delta_H$  : 1,89 ppm) avec H-2' ( $\delta_H$  : 3,80) qui eux, sont orientés dans l'autre sens et ne corrélient donc pas avec les protons cités précédemment (Figure 93).



**Figure 93 : Corrélations observées sur le spectre NOESY du composé 1b (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, et DMSO-*d*<sub>6</sub>) 1,4,6-trihydroxy-1,2'-époxy-6-[10'(Z)-heptadécényl]-2-cyclohexène**

Le composé **1b** provient de la cyclisation de la forme **1a** par attaque nucléophile de l'alcool en C<sub>2'</sub> sur la cétone en C<sub>1</sub> générant ainsi une forme héli-acétalique en proportion variable suivant le solvant ou la température.

**Tableau 19 : Déplacements chimiques, <sup>1</sup>H NMR et <sup>13</sup>C NMR (500 MHz) de 1a et 1b dans le DMSO D<sub>6</sub>**

<b>1a</b> Positions	$\delta_C$ ppm	$\delta_H$ ppm, <i>J</i> (Hz)	<b>1b</b> Positions	$\delta_C$ ppm	$\delta_H$ ppm, <i>J</i> (Hz)
1	198,7		1	98,1	5,93, <i>s</i> , OH
2	126,1	5,78 ( <i>dd</i> , 10,2, 1,7)	2	127,6	5,49 ( <i>dd</i> , 10,2, 2,0)
3	153,9	6,85 ( <i>dt</i> , 10,2, 1,7)	3	133,3	5,59 ( <i>dd</i> , 10,2, 1,4)
4	63,7	4,49, <i>m</i> 4,73 ( <i>d</i> , 5,5, OH)	4	63,7	4,23, <i>m</i> 4,73 ( <i>s</i> , OH)
5	44,0	1,80 ( <i>m</i> , H <sub>a</sub> ) 2,39 ( <i>ddd</i> , 13,6, 5,0, 1,7, H <sub>b</sub> )	5	41,8	1,55, <i>m</i> , H <sub>a</sub> 1,94 ( <i>ddd</i> , 12,8, 5,2, 1,2 H <sub>b</sub> )
6	73,4	5,35, <i>s</i> , OH	6	78,5	4,20, <i>s</i> , OH
1'	43,6	1,60 ( <i>dd</i> , 14,7, 9,7, H <sub>a</sub> ) 1,78 ( <i>dd</i> , 14,7, 2,4, H <sub>b</sub> )	1'	44,3	1,82, <i>m</i> , H <sub>a</sub> 1,89, <i>m</i> , H <sub>b</sub>
2'	66,8	3,72, <i>m</i> 4,37 ( <i>d</i> , 6,0, OH)	2'	75,8	3,80, <i>m</i>
			3'	38,0	1,42, <i>m</i> , H <sub>a</sub> 1,55, <i>m</i> , H <sub>b</sub>
4'-8'	25,5-29,7	1,21-1,35, <i>m</i>	4'-7'	25,5-29,7	1,21-1,35, <i>m</i>
9'	27,0	1,99, <i>m</i>	9'	27,0	1,99, <i>m</i>
10'-11'	130,1	5,34, <i>m</i>	10'-11'	130,1	5,34, <i>m</i>
12'	27,0	1,99, <i>m</i>	12'	27,0	1,99, <i>m</i>
13'-14'	25,5-29,7	1,21-1,35, <i>m</i>	13'-14'	25,5-29,7	1,21-1,35, <i>m</i>
15'	31,6	1,21-1,35, <i>m</i>	15'	31,6	1,21-1,35, <i>m</i>
16'	22,6	1,21-1,35, <i>m</i>	16'	22,6	1,21-1,35, <i>m</i>
17'	14,4	0,86 ( <i>t</i> , 7,1)	17'	14,4	0,86 ( <i>t</i> , 7,1)

**Tableau 20 : Déplacements chimiques,  $^1\text{H}$  NMR et  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz) de **1a** et **1b** dans le  $\text{CDCl}_3$**

<b>1a</b> Positions	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, $J$ (Hz)	<b>1b</b> Positions	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, $J$ (Hz)
1	201,8		1	98,1	
2	125,8	6,05 ( <i>dd</i> , 10,1, 0,5)	2	126,4	5,64, ( <i>dd</i> , 10,2, 2,0)
3	149,6	6,86 ( <i>ddd</i> , 10,1, 4,2, 1,2)	3	133,8	5,83 ( <i>dd</i> , 10,2, 1,4)
4	63,6	4,59 ( <i>q</i> , 8,2, 4,2)	4	64,6	4,53, <i>m</i>
5	40,3	2,24, <i>m</i> , $\text{H}_a$ 2,53 ( <i>ddd</i> , 14,5, 3,4, 1,3, $\text{H}_b$ )	5	40,5	1,69, <i>m</i> , $\text{H}_a$ 2,26 ( <i>ddd</i> , 12,8, 5,2, 1,2 $\text{H}_b$ )
6	74,2		6	79,0	
1'	44,5	1,70, <i>m</i> , $\text{H}_a$ 1,99, <i>m</i> , $\text{H}_b$	1'	44,3	1,90 ( <i>dd</i> , 12,6, 9,7, $\text{H}_a$ ) 2,11, <i>m</i> , $\text{H}_b$
2'	69,1	4,10, <i>m</i>	2'	75,8	3,99, <i>m</i>
4'-8'	25,1-29,7	1,22-1,33, <i>m</i>	3'	38,0	1,50, <i>m</i> , $\text{H}_a$ 1,66, <i>m</i> , $\text{H}_b$
9'	27,2	2,05, <i>m</i>	4'-7'	25,5-29,7	1,2-1,33, <i>m</i>
10'-11'	130,2	5,32, <i>m</i>	9'	27,2	2,05, <i>m</i>
12'	27,2	2,05, <i>m</i>	10'-11'	130,2	5,32, <i>m</i>
13'-14'	25,5-29,7	1,22-1,33, <i>m</i>	12'	27,2	2,05, <i>m</i>
15'	22,6	1,22-1,33, <i>m</i>	13'-14'	25,5-29,7	1,22-1,33, <i>m</i>
16'	31,6	1,22-1,33, <i>m</i>	15'	22,6	1,22-1,33, <i>m</i>
17'	14,4	0,86 ( <i>t</i> , 7,0)	16'	31,6	1,22-1,33, <i>m</i>
			17'	14,4	0,86 ( <i>t</i> , 7,0)

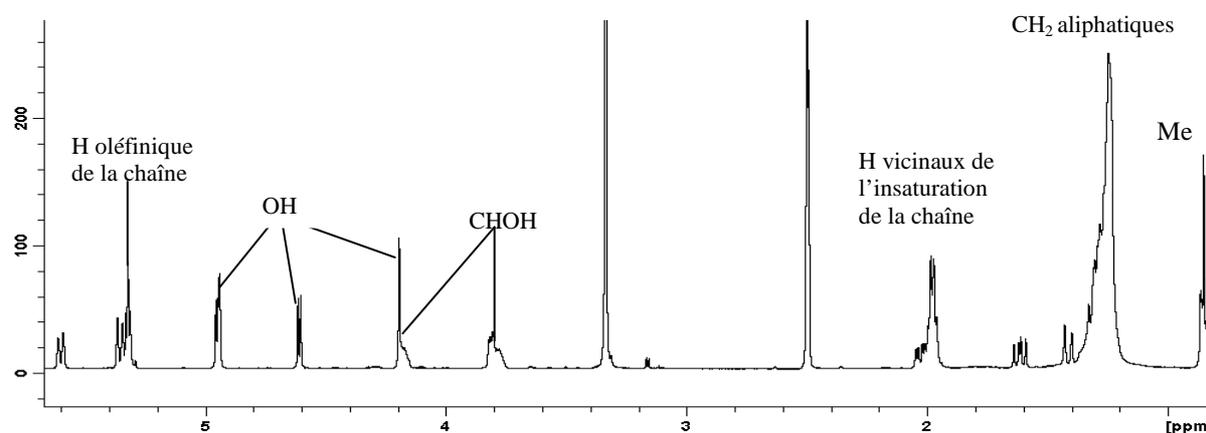
### 4.3. Identification du composé **2**

Les analyses en spectrométrie de masse haute résolution de type ESI-Q-TOF-SMHR révèlent un ion quasi-moléculaire de  $m/z = 383,313$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) (avec une précision de 8 ppm) correspondant à la formule brute  $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_4$ . Ce composé se présente sous la forme d'un corps gras transparent optiquement actif,  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +35^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c : 1,1$ ). Son spectre infra-rouge se caractérise par des maxima d'absorption à  $\nu_{\text{max}}$  3343 (large bande d'absorption des fonctions alcools), 3005 (insaturations), 2925, 2854, 1655, 1465  $\text{cm}^{-1}$  (chaîne carbonée). Le spectre UV se compose de maxima d'absorption à  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$  ( $\log \epsilon$ ): 293 (2,06), 242 (2,24) nm.

Le spectre de RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) du composé **2** est proche de celui du composé **1a**, à la différence de l'absence de cétone conjuguée (les protons oléfiniques considérés sont moins déblindés :  $\delta_{\text{H}}$ : 5,36 et 5,62 ppm) et d'une fonction OH supplémentaire. Ce spectre est partagé en deux parties, l'une constituée de signaux de déplacements chimiques plus élevés ( $3,78 < \delta_{\text{H}} < 5,62$  ppm) par rapport à l'autre ( $0,85 < \delta_{\text{H}} < 2,03$  ppm) (Figure 94).

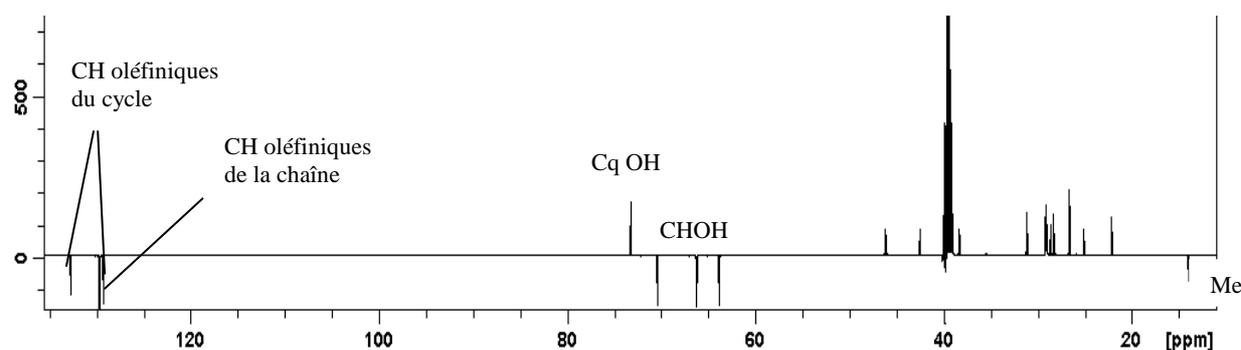
La première zone regroupe les signaux de deux doubles liaisons ( $\delta_H$  : 5,62 ppm, *d*,  $J_{vic}$  : 10,3 Hz ; et  $\delta_H$  : 5,36 ppm, *dt*,  $J = 10,3, 1,8$  Hz) et ( $\delta_H$  : 5,32 ppm, 2H, *m*, correspondant à l'insaturation de la chaîne alkyle décrite précédemment). Cette partie du spectre comprend également de multiples signaux correspondant aux protons de fonctions OH ( $\delta_H$  : 4,20, 4,60, 4,94 et 4,95 ppm) ainsi qu'aux protons directement portés par 3 des carbones hydroxylés (de déplacements inférieures :  $\delta_H$  : 3,78, 3,81 et 4,20 ppm).

La seconde zone de ce spectre, de haut champ, regroupe des protons aliphatiques appartenant, pour la plupart, à la chaîne mono-insaturée, avec quelques protons aliphatiques de signaux isolés ( $\delta_H$  : 1,42, 1,62, 2,03 ... ppm).



**Figure 94 : Spectre de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*6) du composé 2**

L'analyse du spectre de RMN-<sup>13</sup>C réalisé en *J mod* (500 MHz, DMSO-*d*6) (Figure 95) indique la présence de quatre CH oléfiniques :  $\delta_C$  : 129,3 et 132,7 ppm ainsi que  $\delta_C$  : 129,6 ppm (2 C), ce dernier comprenant les deux carbones oléfiniques de la chaîne insaturée. Le spectre présente également les signaux d'un alcool tertiaire ( $\delta_C$  : 73,3 ppm), de trois alcools secondaires ( $\delta_C$  : 63,9, 66,2 et 70,3 ppm) ainsi que ceux d'un CH<sub>3</sub> et de nombreux CH<sub>2</sub> appartenant à la chaîne carbonée, hormis 2 CH<sub>2</sub> de déplacements plus élevés ( $\delta_C$  : 42,5 et 46,2 ppm).

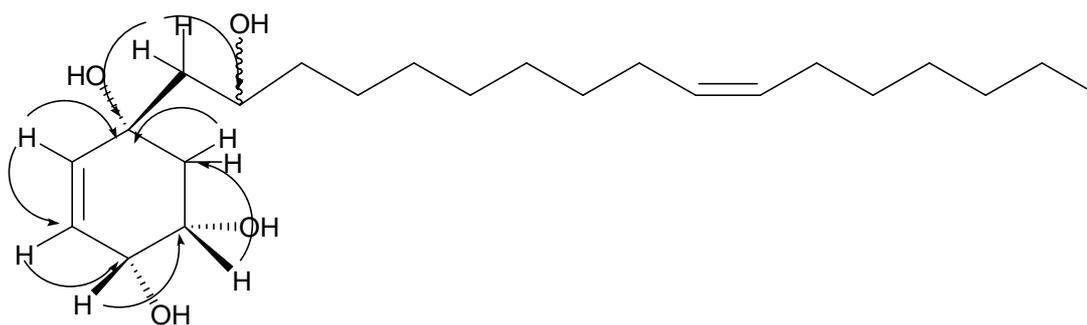


**Figure 95 : Spectre de RMN-<sup>13</sup>C du composé 2, réalisé en *J mod* (500 MHz, DMSO-*d*6)**

Les corrélations observées sur le spectre 2D HSQC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) permettent, en outre, d'attribuer à chacun des carbones de la chaîne carbonée mono-insaturée les protons qui les substituent ainsi que de distinguer les deux CH<sub>2</sub> de déplacements élevés ( $\delta_C$  : 42,5 et 46,2 ppm) portant les protons :  $\delta_H$  : 1,32 ; 2,03 ppm et  $\delta_H$  : 1,42 ; 1,62 ppm. Ces corrélations permettent également de déduire les déplacements des protons portés par les carbones hydroxylés ( $\delta_H$  : 3,81, 4,20 et 3,78 ppm) et des CHOH considérés ( $\delta_C$  : 63,9, 66,2 et 70,3 ppm).

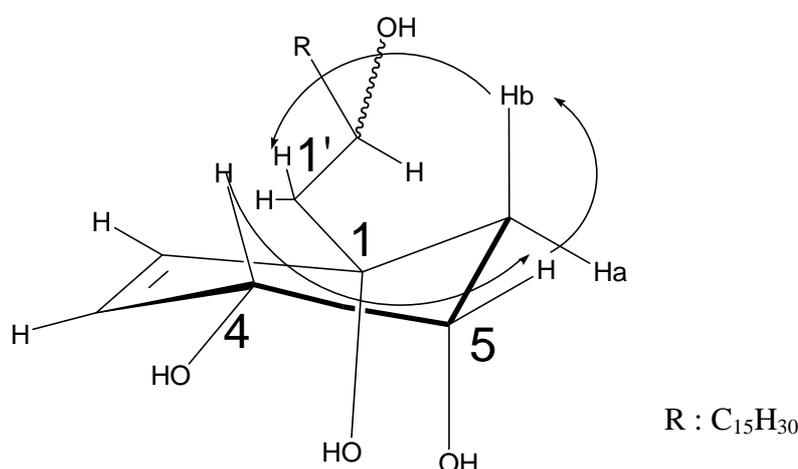
L'analyse du spectre HMBC permet d'attribuer à chaque fonction OH ( $\delta_H$  : 4,20, 4,60, 4,94 et 4,95 ppm) le déplacement chimique du carbone auquel elle est fixée ( $\delta_C$  : 70,3, 63,9, 66,2 et 73,3 ppm). Ce spectre met aussi en évidence la corrélation de la double liaison non incluse dans la chaîne carbonée ( $\delta_H$  : 5,62 et 5,36 ppm,  $J_{vic}$  : 10,3 Hz, de configuration *Z*) avec, d'un côté, le carbone quaternaire hydroxylé ( $\delta_C$  : 73,3 ppm, C<sub>1</sub>), et de l'autre côté, deux CHOH ( $\delta_C$  : 70,3 et 63,9 ppm : C<sub>4</sub> et C<sub>5</sub>). Nous observons également la corrélation du carbone quaternaire C<sub>1</sub> avec les protons des deux CH<sub>2</sub> de déplacements élevés ( $\delta_C$  : 42,5 et 46,2 ppm). Ces deux derniers se différencient grâce, d'une part à leur forte corrélation pour les protons de la chaîne aliphatique (concernant le CH<sub>2</sub> en 1',  $\delta_C$  : 46,2 ppm) et d'autre part, grâce à la corrélation du CH<sub>2</sub> en 6 ( $\delta_C$  : 42,5 ppm) avec les 2 protons géminaux des fonctions OH en  $\alpha$  et  $\beta$  de la double liaison (Figure 96).

Cet ensemble de données permet d'identifier un cycle hexène-triol substitué par une chaîne carbonée au niveau du carbone C<sub>1</sub>, il s'agit du 1,4,5,2'-tétrahydroxy-1-[10'(Z)-heptadécényl]-2-cyclohexène encore inconnu dans le règne végétal.



**Figure 96 : Corrélations observées sur le spectre HMBC du composé 2 (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

La configuration relative de la molécule n'a pu être seulement identifiée avec l'interprétation des constantes de couplages (H-3 : 5,36 ppm (*dt*, 10,3, 1,8), H<sub>b</sub>-6 : 2,03 (*dd*, 13,2, 5,2 Hz) et H-1' : 1,42 (*d*, 14,5 Hz, H<sub>a</sub>) ; 1,62 (*dd*, 14,5, 10,2 Hz, H<sub>b</sub>) qui ne concernent que des protons éloignés les uns des autres et vicinaux de nombreux protons aux signaux indéterminés (quel que soit le solvant utilisé). Néanmoins, les corrélations observées sur le spectre NOESY (CDCl<sub>3</sub>) entre différents protons de la chaîne aliphatique ( $\delta_H$  : 1,57, 1,88, 4,09 ppm correspondant aux protons en 1' et 2') et H<sub>b</sub>-6 ( $\delta_H$  : 2,42 ppm), ainsi que H<sub>b</sub>-6 avec H-5 ( $\delta_H$  : 4,54 ppm) et H-5 avec H-4 ( $\delta_H$  : 4,03 ppm) démontrent que ces différents protons sont situés d'un même côté par rapport au cycle hexénique. Cela nous permet de supposer la configuration relative suivante (Figure 97).



**Figure 97 : Corrélations observées sur le spectre NOESY du composé 2 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (1,4,5,2'-tétrahydroxy-1-[10'(Z)-heptadécényl]-2-cyclohexène)**

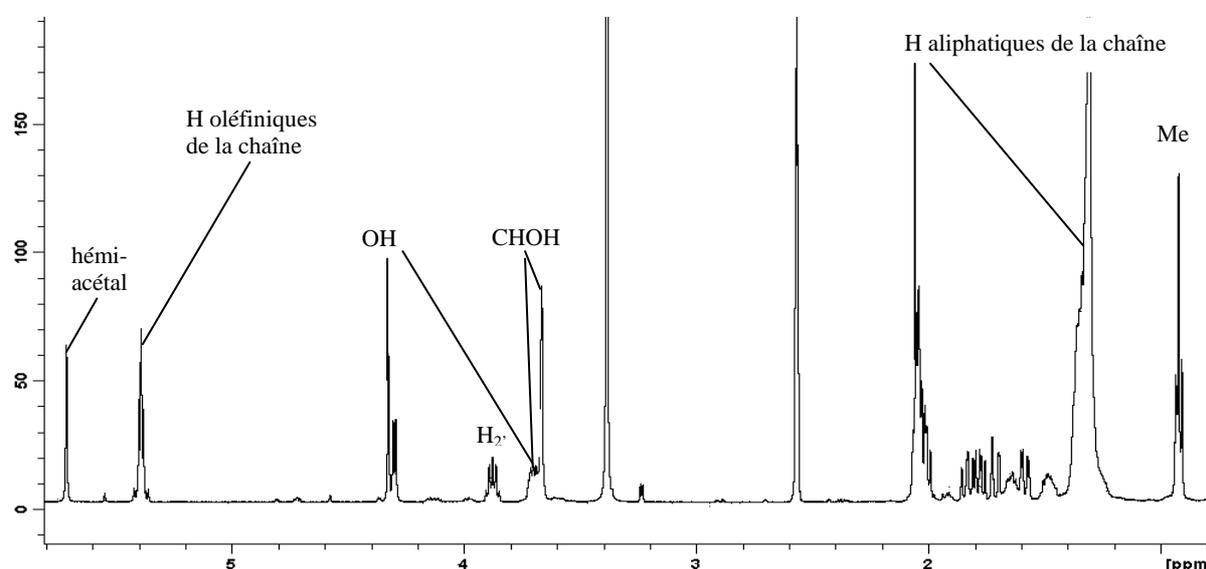
#### 4.4. Identification du composé 3

Les analyses réalisées en spectrométrie de masse haute résolution de type ESI-Q-TOF-HRMS révèlent la masse d'un ion quasi-moléculaire : (M+Na<sup>+</sup>) = 421,299 (avec une précision de 14 ppm) correspondant à la formule brute du composé **3** C<sub>23</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>. Ce composé possède l'aspect d'un corps gras translucide polarisant la lumière ( $[\alpha]_D^{25} = -9,6^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, c : 1,6)). Son spectre infra-rouge présente des maxima d'absorption à  $\nu_{\max}$  3524, 3382, 3200 (larges bandes des fonctions alcools), 2925, 2854, 1731, 1465 cm<sup>-1</sup> (chaîne carbonée).

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz dans le DMSO-d<sub>6</sub>) du composé **3** (Figure 98) présente des signaux similaires à ceux observés pour la molécule **1b**, à la différence d'une fonction OH

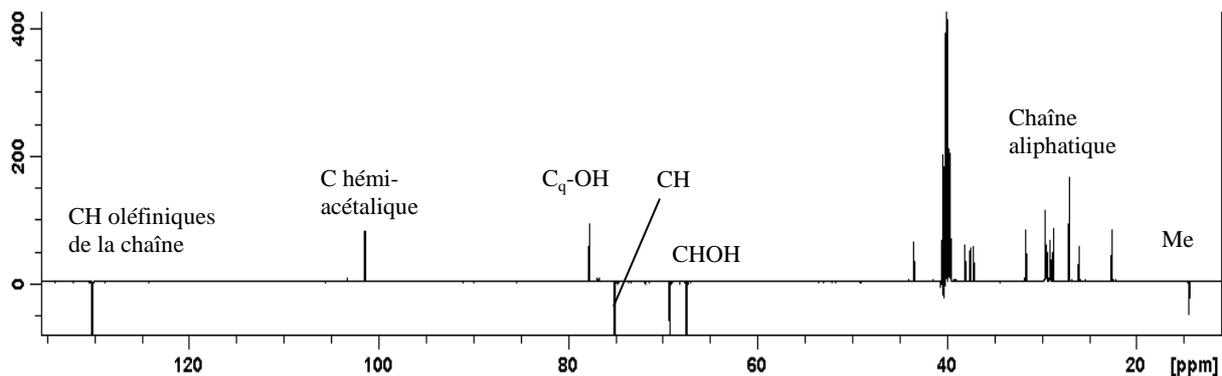
supplémentaire et de l'absence d'une des deux insaturations. Ce spectre est partagé en deux parties, une zone de signaux de résonance à faible champ, avec la présence de quatre fonctions OH ( $\delta_H$  : 3,61, 4,24, 4,27 ppm) dont un plus déblindé ( $\delta_H$  : 5,65 ppm), appartenant à une fonction hémi-acétalique) ainsi que les protons directement portés par les carbones hydroxylés (moins déblindés, à  $\delta_H$  : 3,61 et 3,64 ppm). Nous observons également dans cette partie du spectre les signaux des deux protons oléfiniques de la chaîne mono-insaturée ( $\delta_H$  : 5,34 ppm).

La partie de plus haut champ est constituée des protons aliphatiques de la chaîne mono-insaturée ainsi que de certains signaux isolés correspondant aux protons de 3 CH<sub>2</sub> ( $\delta_H$  : 1,65 et 1,97, *d*,  $J_{gem} = 14,5$  Hz;  $\delta_H$  : 1,53 et 1,77, *d*,  $J_{gem} = 13,5$  Hz ; et  $\delta_H$  : 1,72 et 1,95 ppm).



**Figure 98 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz dans le DMSO-*d*6) du composé 3**

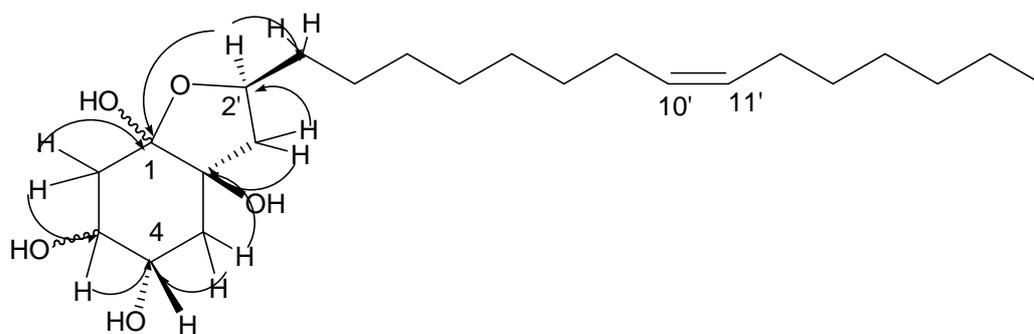
L'analyse du spectre de RMN-<sup>13</sup>C réalisé en *J mod* (500 MHz, DMSO-*d*6) indique la présence de deux carbones quaternaires (en jonction de cycles,  $\delta_C$  : 77,7 et 101,4 ppm) dont un carbone hémi-acétalique (déplacement chimique caractéristique à  $\delta_C$  : 101,4 ppm) (Figure 99). Nous observons également les signaux des deux carbones oléfiniques de la chaîne insaturée ( $\delta_C$  : 130,2 ppm), de trois CH ( $\delta_C$  : 67,4, 69,2 et 75,0 ppm) ainsi que des carbones appartenant à la chaîne aliphatique, hormis certains CH<sub>2</sub>, de déplacements chimiques plus élevés ( $\delta_C$  : 37,2, 37,5 et 43,5 ppm).



**Figure 99 : Spectre du composé 3 de RMN-<sup>13</sup>C réalisé en *J mod* (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**

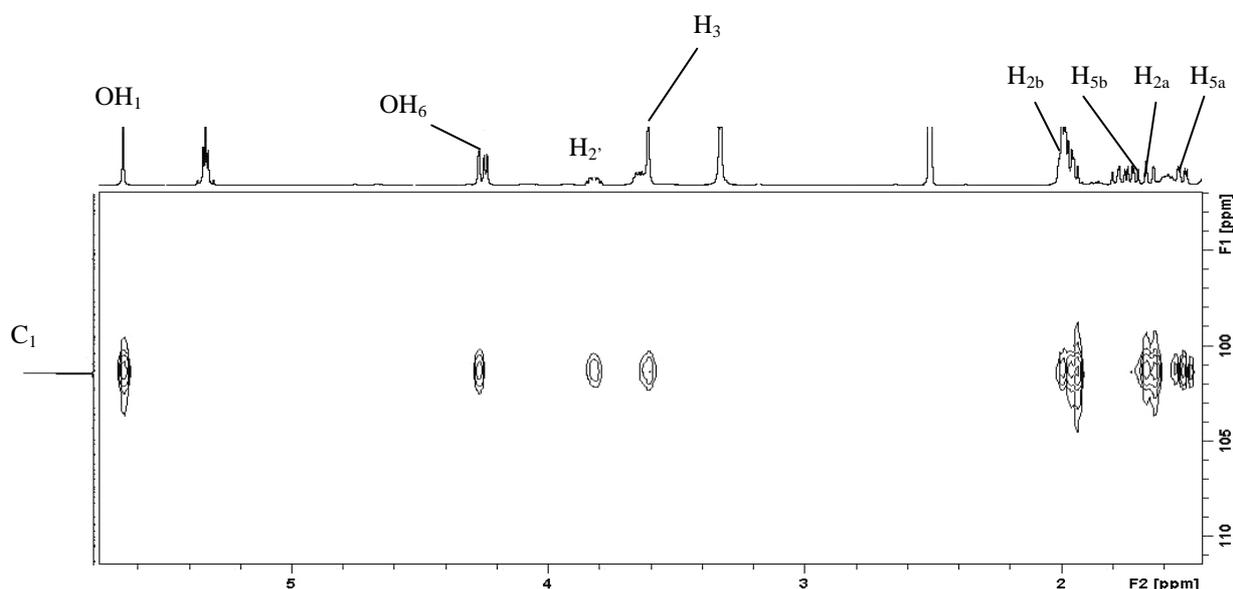
Les corrélations observées sur le spectre 2D HSQC (DMSO-*d*<sub>6</sub>) permettent, en outre, d'attribuer à chacun des carbones de la chaîne carbonée les protons qui les substituent ainsi que d'attribuer aux trois CH<sub>2</sub>, de déplacements élevés ( $\delta_C$  : 37,2, 37,5 et 43,5 ppm) les protons qu'ils portent :  $\delta_H$  : 1,65, 1,97 / 1,53, 1,77 et 1,72, 1,95 ppm. Ces corrélations permettent également de déduire les déplacements de deux protons ( $\delta_H$  : 3,61 et 3,64 ppm) substituant deux carbones hydroxylés ( $\delta_C$  : 69,2 et 67,4 ppm).

L'analyse du spectre HMBC (Figure 100) permet de préciser les déplacements chimiques des carbones substitués par les fonctions OH ( $\delta_C$  : 67,4, 69,2, 77,7 et 101,4 ppm corrélant à  $\delta_{OH}$  : 4,24, 3,61, 4,27 et 5,65 ppm). La suite de l'identification structurale repose sur l'analyse des corrélations des protons des 3 CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  : 37,2, 37,5 et 43,5 ppm) cités précédemment. En effet, les protons de  $\delta_H$  : 1,65, 1,97 ppm (*d*,  $J_{gem} = 14,5$  Hz, liés au CH<sub>2</sub> :  $\delta_C$  : 37,2 ppm) corrélient d'une part avec le carbone hémi-acétalique ( $\delta_C$  : 101,4 ppm) et d'autre part avec le CHOH ( $\delta_C$  : 69,2 ppm) formant un enchaînement de trois carbones. De plus, les protons de  $\delta_H$  : 1,53 ppm (*dd*,  $J_{gem} = 13,5$  Hz,  $J_{ax-eq} = 4,1$  Hz, H<sub>a</sub>) et  $\delta_H$  : 1,77 ppm (*dd*,  $J_{gem} = 13,5$  Hz,  $J_{ax-ax} = 10,6$  Hz, H<sub>b</sub>) liés au CH<sub>2</sub> :  $\delta_C$  : 37,5 ppm, corrélient d'un coté avec un CHOH ( $\delta_C$  : 67,4 ppm) et de l'autre avec un COH quaternaire ( $\delta_C$  : 77,7 ppm, de jonction de cycle). Enfin, les protons de  $\delta_H$  : 1,72 et 1,95 ppm liés au CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  : 43,5 ppm) corrélient avec le même COH quaternaire dernièrement cité ( $\delta_C$  : 77,7 ppm) ainsi qu'avec un CH ( $\delta_C$  : 75,0 ppm) dont les corrélations avec les protons aliphatiques de la chaîne carbonée prouvent qu'il est le point de jonction entre le cycle et la chaîne. Nous pouvons donc établir l'enchaînement de trois groupes de trois carbones (dont deux ont un carbone commun à  $\delta_C$  : 77,7 ppm) (Figure 100).



**Figure 100 : Corrélations observées sur le spectre HMBC du composé 3 (500 MHz, DMSO-*d*6) (1,3,4,6-tétrahydroxy-1',2'-epoxy-6-[10'(Z)-heptadécényl]-cyclohexane)**

Les corrélations du carbone héli-acétalique C<sub>1</sub> ( $\delta_C$  : 101,4 ppm) avec OH-1 ( $\delta_H$  : 5,65 ppm); OH-6 ( $\delta_H$  : 4,27 ppm); H-3 ( $\delta_H$  : 3,61 ppm) ; H<sub>a</sub>-2 ( $\delta_H$  : 1,65 ppm) ; H<sub>b</sub>-2 ( $\delta_H$  : 1,97 ppm) ; H<sub>a</sub>-5 ( $\delta_H$  : 1,53 ppm) et H<sub>b</sub>-5 ( $\delta_H$  : 1,77 ppm) permettent d'identifier la structure d'un cycle hexanique tétra-hydroxylé lié à un cycle furanique comme en témoigne la corrélation de C<sub>1</sub> avec H-2' ( $\delta_H$  : 3,82) à travers le pont oxygéné du cycle furanique (Figure 101).



**Figure 101 : Corrélations HMBC du carbone héli-acétalique du composé 3 (DMSO-*d*6)**

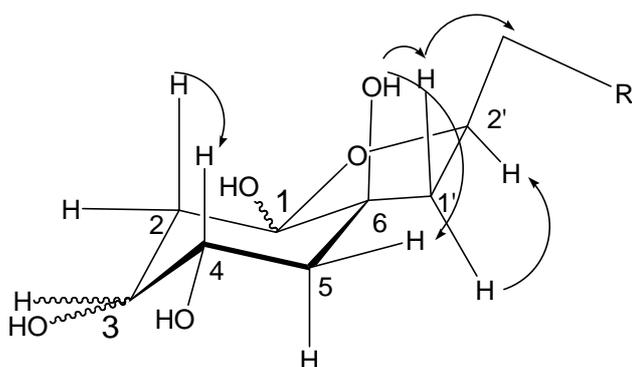
La configuration relative du composé **3** est partiellement identifiée grâce à plusieurs informations fournies par les analyses RMN (dans le DMSO-*d*6) :

- les constantes de couplages observées pour H-4 en position axiale ( $\delta_H$  : 3,64 ppm (*dd*,  $J_{ax-ax} = 10,6$  Hz et  $J_{ax-eq} = 4,1$  Hz) sont communes aux deux protons vicinaux H-5 :  $\delta_H$  : 1,53 ppm (*dd*,  $J_{gem} = 13,5$  Hz,  $J_{ax-eq} = 4,1$  Hz, H<sub>a</sub>

en position équatoriale) et  $\delta_H$  : 1,77 ppm (*dd*,  $J_{gem} = 13,5$  Hz,  $J_{ax-ax} = 10,6$  Hz,  $H_b$  en position axiale)

- les corrélations observées sur le spectre NOESY dans le DMSO-*d6*, bien que ce solvant génère de nombreuses interactions avec les fonctions OH, sont les seules informations dont nous disposons pour établir une configuration relative de la molécule. Ces corrélations ont lieu entre  $H_{a-2}$  ( $\delta_H$  : 1,65 ppm) et H-4 ( $\delta_H$  : 3,64 ppm) ainsi que  $H_{a-5}$  ( $\delta_H$  : 1,53 ppm) avec OH-6 ( $\delta_H$  : 4,27 ppm, intégrant pour un proton), OH-6 avec  $H_{a-1'}$  ( $\delta_H$  : 1,72 ppm), et  $H_{a-1'}$  avec les deux premiers protons de la chaîne aliphatique H-3' ( $\delta_H$  : 1,42 et 1,59 ppm) démontrent que cet ensemble de protons est orienté vers un même coté de la structure cyclique. Ces indications sont vérifiées par la corrélation de H-2' ( $\delta_H$  : 3,82 ppm) avec  $H_{b-1'}$  ( $\delta_H$  : 1,95 ppm), qui ne partagent pas d'autres corrélations avec les autres protons et seraient donc orientés dans l'autre direction par rapport au cycle furanique (Figure 102).

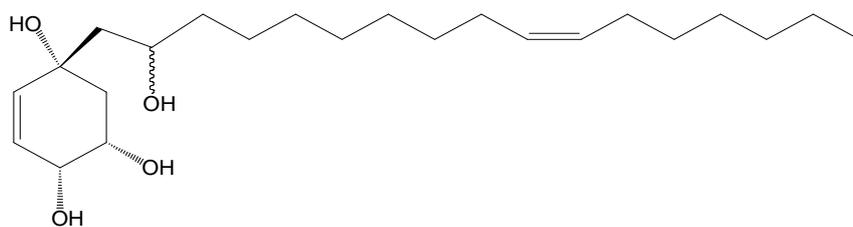
Cependant, le manque de constantes de couplage et la faible corrélation de deux fonctions OH sur les spectres NOESY empêchent la détermination complète de la structure relative du composé **3**. De plus, il faut rappeler que les NOESY enregistrés dans le DMSO-*d6* demeurent hypothétiques pour les fonctions OH.



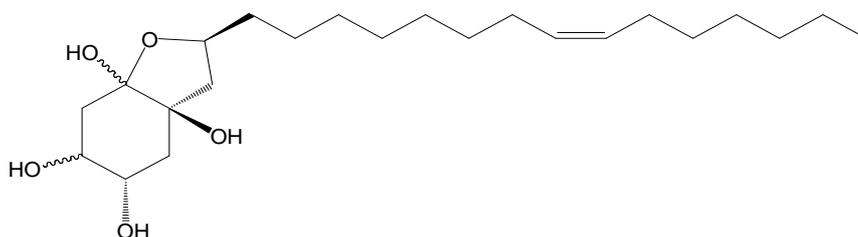
**Figure 102 : Corrélations observées sur le spectre NOESY du composé 3 (500 MHz, DMSO-*d6*)**

**Tableau 21 : Déplacements chimiques  $^1\text{H}$  NMR et  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz) des composés 2, 3 dans le DMSO  $\text{D}_6$**

2 Positions	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, $J$ (Hz)	3 Positions	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, $J$ (Hz)
1	73,3	4,95, <i>s</i> , OH	1	101,4	5,65, <i>s</i> , OH
2	132,7	5,62 ( <i>d</i> , 10,3)	2	37,2	1,65 ( <i>d</i> , 14,5, $\text{H}_a$ ); 1,97 ( <i>d</i> , 14,5, $\text{H}_b$ )
3	129,3	5,36 ( <i>dt</i> , 10,3, 1,8)	3	69,2	3,61, <i>m</i> 3,61, <i>m</i> , OH
4	70,3	3,81, <i>m</i> 4,20, <i>m</i> , OH	4	67,4	3,64 ( <i>dd</i> , 10,6, 4,1) 4,24 ( <i>d</i> , 5,7, OH)
5	63,9	4,20, <i>m</i> 4,60 ( <i>d</i> , 5,8, OH)	5	37,5	1,53 ( <i>dd</i> , 13,5, 4,1, $\text{H}_a$ ) 1,77 ( <i>dd</i> , 13,5, 10,6, $\text{H}_b$ )
6	42,5	1,32, <i>m</i> , $\text{H}_a$ 2,03 ( <i>dd</i> , 13,2, 5,2, $\text{H}_b$ )	6	77,7	4,27, <i>s</i> , OH
1'	46,2	1,42 ( <i>d</i> , 14,5, $\text{H}_a$ ) 1,62 ( <i>dd</i> , 14,5, 10,2, $\text{H}_b$ )	1'	43,5	1,72 ( <i>d</i> , 3,3, $\text{H}_a$ ) 1,95, <i>m</i> , $\text{H}_b$
2'	66,2	3,78, <i>m</i> 4,94, <i>m</i> , OH-2'	2'	75,0	3,82, <i>m</i>
3'	38,5	1,20-1,36, <i>m</i>	3'	38,1	1,42, <i>m</i> , $\text{H}_a$ 1,59, <i>m</i> , $\text{H}_b$
4'	25,1	1,20-1,36, <i>m</i>	4'	26,0	1,21-1,33, <i>m</i>
5'-8'	28,3-29,2	1,20-1,36, <i>m</i>	5'-8'	28,7-29,6	1,21-1,33, <i>m</i>
9'	26,6	1,98, <i>m</i>	9'	27,1	1,99, <i>m</i>
10'-11'	129,6	5,32, <i>m</i>	10'-11'	130,2	5,34, <i>m</i>
12'	26,6	1,98, <i>m</i>	12'	27,1	1,99, <i>m</i>
13'-14'	28,3-29,6	1,20-1,36, <i>m</i>	13'-14'	28,7-29,6	1,21-1,33, <i>m</i>
15'	22,1	1,20-1,36, <i>m</i>	15'	22,6	1,21-1,33, <i>m</i>
16'	31,2	1,20-1,36, <i>m</i>	16'	31,6	1,21-1,33, <i>m</i>
17'	14,1	0,85 ( <i>t</i> , 7,0)	17'	14,4	0,87 ( <i>t</i> , 7,1)



**Composé (2)**



**Composé (3)**

**Tableau 22 : Déplacements chimiques  $^1\text{H}$  NMR et  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz) des composés 2, 3 dans  $\text{CDCl}_3$  (composé 2) ou  $\text{CD}_3\text{OD}$  (composé 3)**

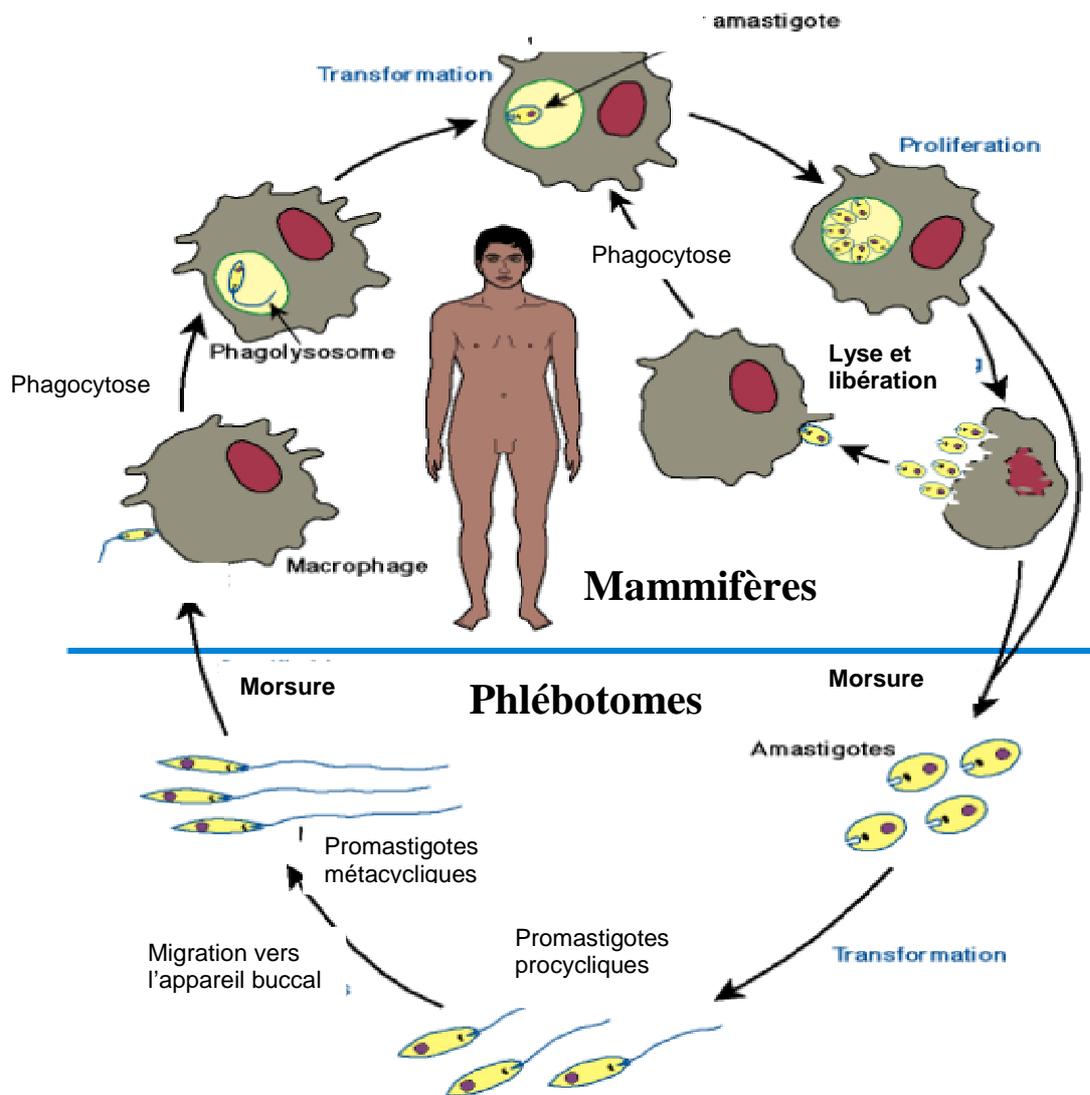
<b>2</b> <b>Positions</b>	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, <i>J</i> (Hz)	<b>3</b> <b>Positions</b>	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, <i>J</i> (Hz)
<b>1</b>	73,5		<b>1</b>	101,9	
<b>2</b>	132,5	5,87 ( <i>dd</i> , 10,3, 1,6)	<b>2</b>	37,6	1,73, <i>m</i> , H <sub>a</sub> 1,89, <i>m</i> , H <sub>b</sub>
<b>3</b>	129,3	5,61 ( <i>dt</i> , 10,3, 2,1)	<b>3</b>	68,8	3,81, <i>m</i>
<b>4</b>	70,3	4,03 ( <i>dd</i> , 2,2, 4,3)			
<b>5</b>	65,3	4,54, <i>m</i>	<b>4</b>	70,9	3,78, <i>m</i>
<b>6</b>	42,3	1,43, <i>m</i> , H <sub>a</sub> 2,42 ( <i>dd</i> , 13,3, 4,9, H <sub>b</sub> )	<b>5</b>	37,2	1,83 ( <i>dd</i> , 14,8 3,8, H <sub>a</sub> ) 2,13 ( <i>dd</i> , 14,8, 3,2, H <sub>b</sub> )
<b>6</b>	42,3	1,43, <i>m</i> , H <sub>a</sub> 2,42 ( <i>dd</i> , 13,3, 4,9, H <sub>b</sub> )	<b>6</b>	79,3	
<b>1'</b>	45,8	1,57 ( <i>dd</i> , 14,8, 1,34, H <sub>a</sub> ) 1,88 ( <i>dd</i> , 14,8, 10,8, H <sub>b</sub> )	<b>1'</b>	44,4	1,87, <i>m</i> , H <sub>a</sub> 1,97, <i>m</i> , H <sub>b</sub>
<b>2'</b>	68,2	4,09, <i>m</i>	<b>2'</b>	77,5	3,96 ( <i>qd</i> , 8,8-6,8)
<b>3'</b>	38,6	1,45-1,55, <i>m</i>	<b>3'</b>	39,3	1,46, <i>m</i> , H <sub>a</sub> 1,67, <i>m</i> , H <sub>b</sub>
<b>4'</b>	25,1	1,20-1,36, <i>m</i>	<b>4'-8'</b>	30,1-30,9	1,21-1,33, <i>m</i>
<b>5'-8'</b>	28,3-29,2	1,20-1,36, <i>m</i>	<b>9'</b>	28,2	1,99, <i>m</i>
<b>9'</b>	27,3	2,03, <i>m</i>	<b>10'-11'</b>	130,9	5,30, <i>m</i>
<b>10'-11'</b>	129,8	5,37, <i>m</i>	<b>12'</b>	28,2	1,99, <i>m</i>
<b>12'</b>	27,3	2,03, <i>m</i>	<b>13'-14'</b>	30,1-30,9	1,21-1,33, <i>m</i>
<b>13'-14'</b>	28,3-29,6	1,20-1,36, <i>m</i>	<b>15'</b>	27,1	1,21-1,33, <i>m</i>
<b>15'</b>	22,1	1,20-1,36, <i>m</i>	<b>16'</b>	23,8	1,21-1,33, <i>m</i>
<b>16'</b>	31,6	1,20-1,36, <i>m</i>	<b>17'</b>	15,1	0,92 ( <i>t</i> , 7,1)
<b>17'</b>	14,1	0,85 ( <i>t</i> , 7,0)			

## **5. Activité biologique des composés isolés de *T. guianensis***

Afin de mieux comprendre l'intérêt thérapeutique de *T. guianensis*, il nous a paru nécessaire de rappeler quelques généralités sur la leishmaniose, maladie pour laquelle cette plante est également utilisée en médecine traditionnelle guyanaise.

### **5.1. Rappels sur la leishmaniose**

Tous comme le *Plasmodium*, le *Leishmania* est un parasite protozoaire. Il est transmis à l'homme (et à d'autres mammifères) par un insecte : le phlébotome (moucheron hématophage) et infecte les macrophages (Figure 103). Le genre *Leishmania* appartient à l'embranchement des Sarcomastigophora, classe des Zoomastigophorasida, ordre des Kinétoplastidés et famille des Trypanosomatidea. De nombreuses espèces existent et sont responsables de pathologies bénignes dans le cas des formes cutanées localisées, ou très graves voire mortelles pour les formes cutanées diffuses, viscérales ou muqueuses. L'espèce testée *in vitro* dans notre travail est *L. amazonensis*, responsable de leishmaniose cutanée en Amérique du Sud.



**Figure 103 : Cycle biologique des parasites du genre *Leishmania***  
 (<http://www.wehi.edu.au/research/overview/inf.html>)

## 5.2. Activités antiplasmodiale, anti-leishmanienne et anti-bactérienne des quatre composés isolés de *Tapirira guianensis*

Afin d'évaluer *in vitro* les activités biologiques pour lesquelles *Tapirira guianensis* est utilisé en médecine traditionnelle, nous avons testé l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et les composés isolés sur d'autres pathogènes que *P. falciparum* [Trager, 1976 ; Desjardins, 1979 ; Benoit, 1995 ; Valentin, 1996, 1997]. Il s'agit de *Leishmania amazonensis* [Sereno, 1997], et de certaines bactéries (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* et *Escherichia coli*) et du champignon responsable du muguet (*Candida albicans*) [Dembry, 1997].

**Tableau 23 : Activités antiplasmodiale et anti-leishmanienne de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et des quatre composés isolés de *Tapirira guianensis***

Souches Echantillons	<i>Plasmodium falciparum</i> CI <sub>50</sub> (µM)		<i>Leishmania amazonensis</i> CI <sub>50</sub> (µM)	Cytotoxicité CI <sub>50</sub> (µM)	Index de sélectivité (cytotoxicité / anti-parasitaire)		
	F32	FcB1	LMA cl1	MCF-7	F32	FcB1	LMA cl1
<b>1a +1b</b>	4,7 ± 0,3	5,4 ± 1,7	1,0 ± 0,1	6,8 ± 0,2	1,4	1,3	6,8
<b>2</b>	86,4 ± 2,6	92,9 ± 1,3	95,5 ± 22,2	34,8 ± 7,7	0,6	0,4	0,4
<b>3</b>	101,8 ± 3,8	159,5 ± 13,8	90,4 ± 7,5	74,1 ± 6,3	1,1	2,1	0,8
<b>Extrait</b>	18,0 ± 3,0	27,0 ± 1,0	38,5 ± 2,5	2,3 ± 0,3	0,7	0,1	0,1
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml			
<b>Chloroquine</b>	60x10 <sup>-3</sup>	0,14	n.d.	>100	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Doxorubicine</b>	n.d.	n.d.	n.d.	0,4	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Amphotericine B</b>	n.d.	n.d.	0,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Les expériences ont été réalisées en doublons.  
(n.d. : non déterminé)

Nous observons une activité antiplasmodiale et anti-leishmanienne maximale pour le mélange **1a 1b**. Les deux autres composés ne sont pas actifs contre ces parasites. De plus, nous remarquons que l'activité et la sélectivité sont plus intéressantes contre *L. amazonensis* (IS : 6,8, CI<sub>50</sub> : 1,0 µM, proche du témoin à l'amphotéricine B) que contre *P. falciparum* (CI<sub>50</sub> : 4,7 µM pour la souche chloroquino-sensible F32 et CI<sub>50</sub> : 5,4 µM pour la souche chloroquino-résistante (FcB1), avec un index de sélectivité moyen de 1,3). Or, l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> initial est plus actif contre *P. falciparum* que sur *L. amazonensis*. Cette différence d'activité entre

l'extrait brut et les composés isolés peut être expliquée par l'éventuelle présence d'autres molécules antiplasmodiales non isolées, ou par l'activité complémentaire ou synergique de ces molécules qui seraient peu actives séparément.

**Tableau 24 : Activités anti-bactérienne de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et des quatre composés isolés de *Tapirira guianensis***

Echantillons	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	CI <sub>50</sub> (µM)	CB (µM)	CI <sub>50</sub> (µM)	CB (µM)
<b>1a + 1b</b>	75,4	150,8	17,6	35,2
<b>2</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>3</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	250 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml
<b>Méthiciline</b>	2,0	5,0	2,0	5,0

Deux séries d'expériences ont été réalisées pour mesurer la bactéricidie (BC) et la concentration inhibitrice à 50 % (CI<sub>50</sub>).

CB : concentration bactéricide

n.a. : non actif.

Nous observons dans ce tableau (Tableau 24) qu'une activité bactéricide intéressante est obtenue avec les composés **1a 1b** contre 2 espèces de staphylocoque (*S. aureus*, CB : 150,8 µM, et surtout contre *S. epidermidis*, CB : 35,2 µM, proche de l'activité de la méthiciline). Aucune activité n'est décelée pour les composés **2** et **3**, ou contre *Escherichia coli* et *Candida albicans*.

Malgré les similitudes structurales des quatre composés, seul le mélange **1a 1b** et l'extrait brut sont actifs sur les parasites et les germes testés. Ces résultats confirment les usages traditionnels de la plante en application externe contre la leishmaniose et autres infections cutanées, et pas contre le muguet (due à *Candida albicans*) qui impliquerait peut être un autre type d'extrait [Agripino, 2004].

Concernant l'activité antiplasmodiale, (sur F32, CI<sub>50</sub> = 4,7 µM ; et sur FcB1, CI<sub>50</sub> = 5,4 µM) nous constatons qu'elle est moyenne et peu sélective. En revanche, cette activité est à la fois présente contre la souche de *P. falciparum* résistante à la chloroquine (FcB1) et contre la souche chloroquino-sensible (F32).

L'activité anti-bactérienne des composés isolés est également intéressante car elle concerne des germes pouvant donner lieu à des infections cutanées (*S. aureus* et *epidermidis*), infections pour lesquelles la cytotoxicité du remède est de moindre impact puisque son application est externe.

Enfin, l'activité biologique valorisant au mieux ces composés est l'activité leishmanicide ( $CI_{50} = 1,0 \mu\text{M}$ ) sur *Leishmania amazonensis*, responsable d'affections cutanées et cutanéomuqueuses.

Les effets secondaires potentiels de cette drogue liés à sa cytotoxicité ( $CI_{50}$  de l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 2,3 \mu\text{g/ml}$ ) sont limités car son application est externe et l'activité recherchée est sélective [Suffness, 1988]. De plus, l'arsenal thérapeutique actuel utilisé contre la leishmaniose est pauvre (dérivés d'antimoine, pentamidine, amphotéricine B...) et génère de nombreux effets secondaires. *Tapirira guianensis*, espèce très répandue en Amérique du Sud, représente donc une alternative thérapeutique considérable contre la leishmaniose cutanée et ses éventuelles sur-infections à staphylocoque liées à cette maladie.

# F DISCUSSION ET CONCLUSION

## 1. Sélection botanique et chimique des substances actives par bioguidage

L'évaluation de l'activité anti-paludique d'une plante est complexe et requiert de nombreux outils d'analyse. Dans le cas de cette étude, l'efficacité d'une plante a été démontrée par l'activité *in vitro* de l'un de ses extraits contre *P. falciparum*. Il est certain que de nombreuses plantes ne répondent pas de manière positive à ce type de test mais possèdent tout de même une activité contre le paludisme (plantes soignant la symptomatologie de la maladie ou potentialisant d'autres drogues...). La notion d'efficacité d'une plante est également dépendante du type de médecine dans laquelle elle est employée, elle varie donc selon les cultures. En conséquent, nous ne pouvons absolument pas affirmer que les plantes inactives sur *P. falciparum*, *in vitro*, sont dénuées d'efficacité contre le paludisme. Néanmoins la reproductibilité, la simplicité et l'objectivité des tests *in vitro* permettent une sélection rationnelle des plantes potentiellement anti-paludiques.

### 1.1. Intérêts du bioguidage

Le bioguidage *in vitro* (sur *P. falciparum*) est une technique de recherche qui s'est avérée indispensable au cours de ce travail. En effet, les tests biologiques ont non seulement permis la sélection d'espèces végétales biologiquement actives, mais aussi d'orienter la purification et l'isolement des molécules antiplasmodiales. La relative simplicité et reproductibilité de ces tests (fondés sur la compétence des professionnels engagés) ont mené à l'élaboration d'un travail scientifique intégrant de manière complémentaire la biologie et la phytochimie. Cependant, le bioguidage possède certaines limites qu'il est important de préciser afin de mieux interpréter les résultats obtenus.

## 1.2. Limites du bioguidage

### 1.2.1. Limites du bioguidage inhérentes à la purification des principes actifs (« limites phytochimiques »)

L'analyse globale des résultats obtenus montre une « perte d'activité » au cours des purifications par rapport aux résultats théoriquement prévus. En effet, si nous considérons le cas de *P. cuspidata*, nous constatons une  $CI_{50}$  du totum alcaloïdique de 3,5 µg/ml. Or, le composé majoritaire et le plus actif est caractérisé par une  $CI_{50}$  antiplasmodiale de 0,6 µg/ml seulement, alors qu'il représente moins de 1 % du totum alcaloïdique (sa  $CI_{50}$  théorique aurait du être inférieure à  $3,5/100 = 0,035$  µg/ml). L'activité antiplasmodiale n'évolue donc pas de manière linéaire au cours des purifications.

Différentes raisons d'ordre pharmacologique ou physique peuvent expliquer ces aléas.

- Un extrait total renferme de très nombreuses molécules, qui, testées séparément peuvent n'avoir que très peu d'activité. Dans le cas de molécules possédant des effets synergiques (activités contre le parasite sur une même voie métabolique) ou des effets de potentialisation (activités contre le parasite sur des voies différentes et complémentaires) [Aïache, 1978], nous observons une activité anti-parasitaire plus importante lorsque ces molécules sont testées ensemble. La purification de tels composés ne conduit donc pas à une concentration linéaire de l'activité.
- La purification de composés implique parfois des manipulations dénaturant les principes actifs. Par exemple : des substances actives volatiles peuvent s'évaporer à l'air ambiant ou à l'évaporateur rotatif ; dans le cas d'extractions à chaud, la température peut altérer les composés ; l'utilisation d'acides ou de bases (dans les extractions d'alcaloïdes) peut hydrolyser certaines structures ; des impuretés ou solvants réactifs peuvent modifier les molécules isolées... Tous ces paramètres expérimentaux agissent donc sur l'évolution de l'activité biologique au cours des purifications.

## 1.2.2. Limites du bioguidage induites par les tests biologiques

Les tests utilisés lors du bioguidage *in vitro* doivent être simples et rapides et sont souvent peu représentatifs des conditions naturelles. Dans notre cas, le test standard employé sur *P. falciparum* ne concerne que la partie endo-érythrocytaire du cycle du parasite. Or un certain nombre de principes actifs agissent également sur la période exo-érythrocytaire du cycle. Enfin, il existe également de nombreux principes actifs qui interagissent indirectement sur le métabolisme enzymatique de l'hôte ou qui nécessitent une transformation enzymatique avant d'être actifs (comme les prodrogues). Par conséquent, les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas totalement représentatifs de l'activité anti-paludique de l'échantillon. De plus, les souches de *Plasmodium* utilisées ne sont pas sauvages, et les conditions de culture (parasitémie, milieu...) sont peu comparables aux conditions biologiques naturelles. La singularité des conditions de culture *in vitro* permet d'expliquer bon nombre d'échecs lorsque l'on essaie de transposer les résultats au monde « *in vivo* ».

Par ailleurs, les tests *in vivo* font également intervenir deux autres paramètres majeurs induisant la variabilité des résultats, il s'agit de la biodisponibilité et de l'individualité. En effet, l'activité d'une substance est modulée par son administration, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme et son élimination, et cela de manière variable suivant les espèces et les individus. La sensibilité à la maladie varie elle aussi suivant les individus, y compris au sein d'un même clone. De plus, l'espèce de *Plasmodium* utilisée dans les tests *in vitro* (*P. falciparum*) est différente de celle employée *in vivo* (*P. vinckei petter*). Dans ces conditions, il est compréhensible qu'un test réalisé sur un être vivant soit d'autant plus incertain que cet être vivant possède un organisme complexe.

Enfin, toute plante ou substance anti-paludique n'est pas nécessairement antiplasmodiale. En effet, le paludisme est mortel dans la plupart des cas s'il atteint le système nerveux central (neuropaludisme). Différentes hypothèses ont été formulées pour expliquer la physiopathogénie du neuropaludisme : trouble de la perméabilité vasculaire, mécanisme immuno-pathologique, coagulation intra-vasculaire et obstruction mécanique des microvaisseaux, effets métaboliques... L'hypothèse la plus probable envisage un rôle central de la séquestration intracapillaire des érythrocytes infectés par cytoadhérence à l'endothélium en relation avec une réaction inflammatoire. Les sujets sont plus ou moins exposés à cette aggravation suivant leur état immunitaire et leur bagage génétique (ce qui témoigne de la variabilité individuelle évoquée précédemment). Dans le cas de cette atteinte cérébrale, l'administration d'anti-inflammatoires, d'anti-convulsivants, de diurétiques et de vasodilatateurs (limitant la pression intracrânienne)... pourrait aider à sauver le malade. Ces

traitements, bien que symptomatiques, sont d'une importance majeure dans la thérapie anti-paludique et n'ont pourtant pas d'activité antiplasmodiale. Il est donc important de considérer, dans le cas de notre étude, que le bioguidage ne révèle pas directement des espèces d'intérêt thérapeutique, mais plutôt des espèces toxiques pour le *Plasmodium*. On ne peut donc en aucun cas discréditer l'efficacité des remèdes traditionnels par ce genre de critères, mais seulement comprendre et quantifier l'activité de certaines drogues.

### **1.2.3. Conclusions sur la recherche d'anti-paludiques par bioguidage *in vitro*.**

L'ensemble des inconvénients imputés précédemment au bioguidage n'a pour but que de nuancer l'efficacité de cette technique afin d'élargir le champ d'action de nos recherches et d'affiner l'exploitation des résultats.

La purification de composés par bioguidage à partir des plantes permet d'isoler et d'identifier des molécules qui seront peut être les médicaments de demain. Cependant, comme le montrent les schémas thérapeutiques actuels contre le paludisme (et d'autres maladies), c'est en combinant plusieurs de ces substances qu'une meilleure efficacité est obtenue. Il en va de même pour les extraits issus des plantes, le mélange de différents extraits pharmacologiquement sélectionnés peut potentialiser chacun des remèdes qu'il comporte pour finalement permettre une efficacité comparable à celle des médicaments commercialisés actuellement et cela à moindre coût. Les remèdes provenant des médecines traditionnelles, bien que plus difficilement contrôlables d'un point de vue qualitatif, constituent donc encore de nos jours des ressources thérapeutiques majeures contre le paludisme et bien d'autres maladies.

## **2. Résultats obtenus**

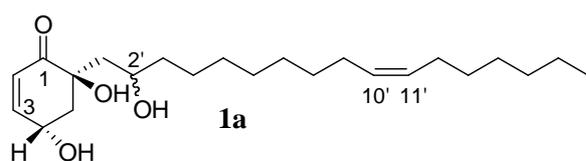
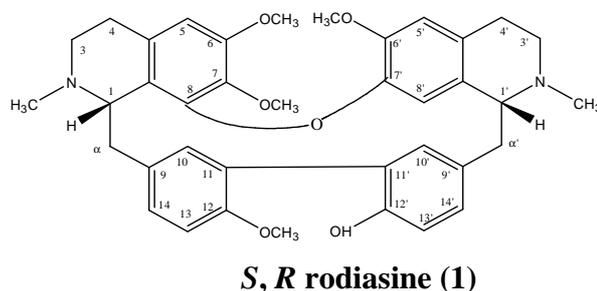
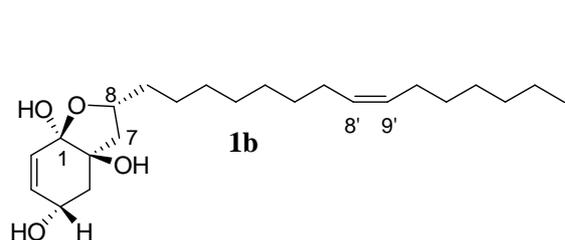
L'enquête ethnopharmacologique réalisée fournit quelques uns des éléments requis pour l'adaptation et la coordination de deux médecines d'origine culturelle et géographique distincte mais d'objectif commun. Cette étude permet à court terme l'analyse nouvelle de plantes médicinales. A plus long terme ce travail nous apporte des informations sur le contexte culturel de la maladie permettant de mieux adapter les traitements contre celle-ci.

Les recherches phytochimiques réalisées sur les deux espèces *Pseudoxandra cuspidata* Maas et *Tapirira guyanensis* Aubl. consistaient en l'identification des principes actifs antiplasmodiaux de ces plantes. Pour les raisons précédemment énoncées, seuls quatre composés ont été isolés de chaque plante, les autres produits d'activité antiplasmodiale peu élevée n'ont pas été étudiés.

Aucune description phytochimique de l'espèce *P. cuspidata* n'ayant été publiée jusqu'à présent, l'identification de quatre alcaloïdes, dont un nouveau (de la famille des aza-anthracènes) permet de caractériser chimiquement cette plante.

Concernant *T. guianensis*, des alkyl-hexénols avaient déjà été décrits dans cette espèce, mais les quatre composés que nous avons identifiés étaient jusque là inconnus. Ce travail apporte donc des informations concernant la chimie des composés d'origine naturelle et plus précisément celle des Anacardiaceae.

Au niveau thérapeutique, les principes actifs retenus pour leurs propriétés anti-parasitaires sont la 1*S*, 1'*R* rodiasine (contre *P. falciparum*) isolée de *P. cuspidata*, et le mélange en équilibre cyclo-hexénone / alkyl-hexénol (**1a** / **1b**) (contre *L. amazonensis*) provenant de *T. guianensis*.



### 3. Applications thérapeutiques potentielles des composés et des extraits actifs

L'isolement en grande quantité de ces produits actifs (50 mg à 1 g) permettra d'approfondir nos connaissances sur les interactions et la pharmacologie de ces composés.

Nous pouvons également envisager des hypothèses de protocoles thérapeutiques à partir des plantes étudiées.

Il est prouvé que certaines bisbenzyloquinoléines potentialisent l'activité anti-paludique des dérivés de la quinine [Frappier, 1996]. Or, les résultats obtenus démontrent l'activité antiplasmodiale de la 1S, 1'R rodiasine (une bisbenzyloquinoléine) contre des souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium*. L'extrait alcaloïdique de *P. cuspidata* (extraction à l'eau acidifiée ou par décoction...) administré avec un traitement de base à la chloroquine (ou un extrait de *Cinchona sp.*) pourrait donc constituer un remède simple, accessible et efficace contre le paludisme chloroquino-résistant.

Les composés issus de *T. guianensis* sont des corps relativement gras, actifs contre la leishmaniose cutanée ainsi que contre d'éventuelles sur-infections bactériennes. Une préparation à base de décocté d'écorce évaporé à chaud et incorporé à de la cire d'abeille ou/et de la graisse animale (matières premières souvent disponibles en forêt) permettrait la mise en forme d'un onguent, d'une pommade ou d'un cérat adéquat pour traiter ces maladies cutanées.

Enfin, concernant les huit plantes actives contre la souche chloroquino-résistante de *P. falciparum* et procédant de l'étude ethnopharmacologique réalisée en Amazonie péruvienne, cinq d'entre elles présenteraient un intérêt thérapeutique dans le cas de préparations à base d'extraits simples ou améliorés. Il s'agit des espèces *Cyphomandra hartwegii* (Solanaceae), *Lacistema aggregatum* (Lacistemaceae), *Sabicea villosa* (Rubiaceae), *Virola calophylla* (Myristicaceae) et *Abuta rufescens* (Menispermaceae), ces plantes pourraient constituer une alternative thérapeutique, ou un complément, à la quinine fréquemment employée.

## 4. Conclusion

Suite à une première partie bibliographique consacrée à la description du paludisme, nous avons procédé à l'analyse des pratiques médicales traditionnelles observées en Amazonie (d'un point de vue ethnopharmacologique), pour nous orienter dans un dernier temps vers l'étude de plantes provenant de ces pharmacopées (notamment d'origine guyanaise et péruvienne).

L'approche ethnologique de la maladie et, plus particulièrement, du paludisme chez les Quechua d'Amazonie péruvienne que nous avons effectué sur le terrain (notamment chez les quechua du Pastaza) enrichit notre travail de plus amples connaissances sur cette maladie et confère à nos résultats un cadre d'application.

Les travaux réalisés ont permis l'évaluation de l'activité antiplasmodiale (cycle endo-érythrocytaire) d'une quarantaine d'espèces végétales d'Amazonie. Parmi ces espèces, 12 se sont révélées actives contre *P. falciparum in vitro*, dont 5 possèdent des activités particulièrement intéressantes compte tenu des CI<sub>50</sub> (< 10 µg/ml pour différents extraits bruts), de leurs sélectivités et de leur originalité (étant donné la rareté des données bibliographiques à leur sujet).

Par la suite, nous avons étudié deux plantes guyanaises afin de connaître les principes actifs responsables de leur activité antiplasmodiale, conduisant à la purification, l'identification chimique et la caractérisation biologique de huit composés parmi lesquels cinq sont caractérisés pour la première fois.

Parmi ces composés isolés, quatre possèdent une activité antiplasmodiale. Il s'agit de deux bisbenzylisoquinoléines (provenant de *Pseudoxandra cuspidata* Maas) et du mélange alkyl cyclo-hexénone (**1a**) alkyl hexénol (**1b**) (issu de *Tapirira guianensis* Aubl.).

Par ailleurs, le mélange actif (**1a-1b**) possède également des propriétés leishmanicides (contre la forme amastigote de *Leishmania amazonensis*) et bactéricide (contre *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis*) présentant de la sorte un potentiel thérapeutique considérable contre la leishmaniose cutanée.

L'ensemble de nos travaux confirme des propriétés médicinales d'espèces amazoniennes, et contribue à la description scientifique de certaines de ces plantes. D'autres études concernant les plantes de la « pharmacopée Quechua » d'Amazonie péruvienne sont en cours. Elles permettront une application thérapeutique de ces connaissances davantage adaptée aux besoins de ces populations.

Ces travaux d'une durée de trois ans et demi dont 6 mois d'enquête sur le terrain en Amazonie péruvienne, ont donné lieu à deux publications acceptées et à une en révision, dans des revues à comité de lecture (*Planta medica*, *Journal of ethnopharmacology* et *Phytochemistry*).

## G BIBLIOGRAPHIE

Abel, L. (1999). **Apport de l'épidémiologie génétique pour l'étude de la susceptibilité/résistance au paludisme dans les populations humaines.** *Bull. Soc. Path. ex.* **92**, 256-260.

Agripino, D. G., Lima, M. E. L., Da Silva, M. R., Meda, C. I., Da Silva Bolzani, V., Cordeiro, I., Young, M. C. M., Moreno, P. R. H. (2004). **Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest, ecological station Jureia-Itatins.** *Biota neotropica* **4**.

Aïache, J. M., Devissaguet, J.P., Guyot-Hermann, A.M. (1978). *Galenica, biopharmacie.* tec and doc, Paris.

Angerhofer, C. K., Guinaudeau, H., Wongpanich, V., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A. (1999). **Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids.** *J. Nat. Prod.* **62**, 59-66.

Banzouti, J.T. (2003). **Recherche phytochimique de substances naturelles à visée antipaludique à partir de plantes africaines.** Université, Montpellier **1**

Barros, G. S., Matos, F. J., Vieira, J. E. Sousa, M. P., Medeiros, M. C. (1970). **Pharmacological screening of some Brazilian plants.** *J. Pharm. Pharmacol.* **22**, 116-122.

Basco, L. K., Ruggeri, C., Le Bras, J. (1994). *Molécules antipaludiques : mécanismes d'action, mécanismes de résistance et relations structure-activité des schizontocides sanguins.* Masson, Paris.

Benoit-Vical, F. (2005). **Ethnomedicine in malaria treatment.** *IDrugs* **8**, 45-52.

Benoit, F., Valentin, A., Pelissier, Y., Diafouka, F., Marion, C., Kone-Bamba, D., Kone, M., Mallie, M., Yapo, A., Bastide, J. M., Kone, D., Bessiere, J. M., Dakuyo, Z. (1996). **In vitro antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**, 67-71.

Benoit, F., Valentin, A., Pelissier, Y., Marion, C., Dakuyo, Z., Mallie, M., Bastide, J. M. (1995). **Antimalarial activity in vitro of *Cochlospermum tinctorium* tubercle extracts.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**, 217-218.

Bertani, S., Bourdy, G., Landau, I., Robinson, J. C., Esterre, P., Deharo, E. (2005). **Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies.** *J. Ethnopharmacol.* **98**, 45-54.

Bertoni, M. H. S., M. A., Cattaneo, P. (1990). **Chemical composition of pulp, seed and seed oil of ripe fruit of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (Solanaceae).** *A. As. Quim. Arg.* **78**, 359-364.

Bick, I. R., Douglas, G. K. (1965). **Atheroline, a yellow phenolic alkaloid from *Atherosperma moschatum* Labill.** *Tetrahedron Lett.* **28**, 2399-2403.

- Black (1978). **Plant dispersal by native North Americans in the Canadian Subartic.** *Nat. Stat. Ethno.* **1**, 255-262.
- Boger, D. L., Brotherton, C. E. (1984). **Total synthesis of azafluoranthene alkaloids: rufescine and imeluteine.** *J. Org. Chem.* **49**, 4050-4055.
- Boyes, S., Strubi, P. (1997). **Organic acid and sugar composition of three New Zealand grown tamarillo varieties *Solarium betaceum* (Cav.).** *N. Z. J. Crop Hort. Sc.* **25**, 79-83.
- Brown, P. J. (1987). **Microparasites and macroparasites.** *Cult. A.* **2**, 155-171.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales.* EM inter, Paris.
- Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D. H. (1964). *Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds.* Holden-Day, London.
- Cardozo, E., Rubio, M., Rojas, L. B., Usubillaga, A. (2004). **Composition of the essential oil from the leaves of *Eryngium foetidum* L. from the Venezuelan Andes.** *J. E. O. Res.* **16**, 33-34.
- Cava, M. P., Buck, K. T., Noguchi, I., Srinivasan, M., Rao, M. G., et DaRocha, A. I. (1975). **Alkaloids of *Abuta imene* and *A. rufescens*.** *Tetrahedron* **31**, 1667-1669.
- Chavez, M. H., Santos, L.A., Lago, J.H.G, Roque, N.F. (2001). **Alkaloids from *Porcelia macrocarpa*.** *J. Nat. Prod.* **64**, 240-242.
- Cerón, C. E., M., Ayala, C. M. (1998). *Etnobotánica de los huaorani de quehueiri-ono, Napo-Ecuador.* Abya Yala, Quito.
- Cirad-forêt, Doat J.(1993). *Bois des Dom-Tom*, Cirad-forêt, Paris.
- Compagnone, R., Castillo, A., Sciacovelli, L., Monache, F. (1997). **Arabinofuranoside flavonoids from *Tapirira guianensis*.** *Bol. Soc. Chil. Quim.* **42**, 445-448.
- Constanza, R. O., Luis, E. Cuca S., Juan, C. Martinez V. (1998). **Chemical and microbiological study of the ethanolic extracts of leaves and bark of *Virola calophylla* (Myristicaceae).** *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.* **27**, 25-29.
- Correia, S. D., David, J. M., David, J. P., Chai, H. B., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A. (2001). **Alkyl phenols and derivatives from *Tapirira obtusa*.** *Phytochem.* **56**, 781-784.
- Correia, S. J., Juceni, P., David, J., David, M. (2003). **Constituents of the bark of *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae).** *Quim. Nova* **26**, 36-38.
- Cortes, D., Hocquemiller, R., Cavé, A., Saez, J. (1986a). **Alcaloïdes des Annonacées: alcaloïdes mineurs des écorces de *Pseudoxandra sclerocarpa*.** *J. Nat. Prod.* **49**, 854-858.
- Cortes, D., Percy Wannigama, G., Saez, J., Cavé A. (1986b). **Luxandrine, a quaternary benzyloquinoline from *Pseudoxandra sclerocarpa*.** *Phytochem.* **25**, 2693-2695.
- Cortes, D., Saez, J., Hocquemiller, R., Cavé, A. (1985). **Alcaloïdes des Annonacées, LIII. Alcaloïdes de *Pseudoxandra lucida* étude de l'Antioquine et de ses dérivés.** *J. Nat. Prod.* **48**, 76-85.

- 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 Oliveira, A., De Oliveira, G., Carazza, F., Guilherme S. (1987). **Geovanine, a new azaanthracene alkaloid from *Annona ambotay* Aubl.** *Phytochem.* **26**, 2650-2651.
- De Smet, P. A. (1985). **A multidisciplinary overview of intoxicating snuff rituals in the western hemisphere.** *J. Ethnopharmacol.* **13**, 3-49.
- Deharo, E., Bourdy, G., Quenevo, C., Munoz, V., Ruiz, G., Sauvain, M. (2001). **A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians.** *J. Ethnopharmacol.* **77**, 91-98.
- Deharo, E., Gautret Pharmacie., Munoz, V., Sauvain, M. (2000). **Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas.** CYTED. La Paz
- Delaveau, P., Vidal-Tessier, A. M. (1988). **Biologically active substances from tropical woods.** *Bull. Soc. Bot. Fr. R., Actual. Bot.* **135**, 25-36.
- Del Rayo Camacho, M., Kirby, G.C., Warhust D.C., Croft, S.L., Phillipson J.D., (2000). **Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities.** *Planta med.* **66**.
- Dembry, L. M., Farrel, P. A., Orcutt, D. R., Gerrity, L. A., Andriole, V. T. (1997). **In-vitro activity of trovafloxacin against sensitive and resistant aerobic bacteria using the standard microdilution broth method and Etest.** *J. A. C.* **39**, 35-42.
- Descola, P. (2005). **Par-delà nature et culture.** Gallimard, Paris.
- 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.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 710-718.
- Dos Santos, P. R. D., Morais, A. A., Braz, R. (2003). **Alkaloids from *Annona dioica*.** *J. Braz. Chem. Soc.* **14**, 396-400.
- Duke, J. A., Vasquez, R. (1994). **Amazonian Ethnobotanical Dictionary.** Boca Raton, London.
- Escalante, A. A., Freeland, D. E., Collins, W. E., Lal, A. A. (1998). **The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome.** *Nat. Acad. Sc.* **95**, 8124-8129.
- Etkin, N. L. (1988). **Ethnopharmacology: Biobehavioral approaches in the anthropological study of indigenous medicines.** *An. Rev. A.* **17**, 23-42.
- Evans, W. C., Ghani, A., Woolley, V. A. (1972). **Alkaloids of *Cyphomandra betacea* Sendt.** *J. Chem. Soc.* **16**, 2017-2019.
- Eyres, G., Dufour, J. P., Hallifax, G., Sotheeswaran, S., Marriott, P. J. (2005). **Identification of character-impact odorants in coriander and wild coriander leaves using gas**

**chromatography-olfactometry (GCO) and comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC x GC-TOFMS).** *J. Sep. Sc.* **28**, 1061-1074.

Filadoro, M. F. (1991). *Asi se sana en el Alto Napo*. Prodocs, Iquitos.

Forgacs, P., Jacquemin, H., Moretti, C., Provost, J., Touche, A (1983). **Etudes phytochimiques et activités biologiques de 18 plantes de la Guyane Francaise.** *Plant. Méd. Phytothér.* **17**, 22-32.

Franca, F., Lago, E. L., Marsden, P. D. (1996). **Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **29**, 229-232.

Frappier, F., Jossang, A., Soudon, J., Calvo, F., Rasoanaivo, P., et Ratsimamanga-Urverg, S., Saez, J., Schrevel, J., Grellier, P. (1996). **Bisbenzylisoquinolines as modulators of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* and multidrug resistance in tumor cells.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1476-1481.

Garcia De Sotero, D. E., Dalva Assuncao Portari, M., Pavan, R., Jorge, M. F. (2003). **Actividad antioxidante de los frutos de la Sacha mangua (*Grias neubertii* Macbr.).** *Alimentaria* **343**, 87-91.

Garcia, M. D., Saenz, M. T., Gomez, M. A., Fernandez, M. A. (1999). **Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models.** *Phytother. Res.* **13**, 78-80.

Garnham, P. C. C. (1966). *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Blackwell Scientific, New York.

Gentry, A. H. (1993). *A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru): with supplementary notes on herbaceous taxa*. Conservation International, New York.

Gilani, A. H., Rahman, A. U. (2005). **Trends in ethnopharmacology.** *J. Ethnopharmacol.* **100**, 43-49.

Goncalvez, T. A. P., Zborowski M. B., Scheel-Ybert R. (2003). *Colecao de referencia antracologica da madeira de espécies de Anacardiaceae, Aquifoliaceae, Apocynaceae, Araliaceae e compositae de varios biomas brasileiros*. UFRJ, Rio.

Grenand, P., Moretti, C., Jacquemin, H. (1987). *Pharmacopées traditionnelles en Guyane, Créoles, Palikur, Wayapi*. ORSTOM, Paris.

Groweiss, A., Cardellina, J. H., Pannell, L. K., Uyakul, D., Kashman, Y., Boyd, M. R. (1997). **Novel Cytotoxic, Alkylated Hydroquinones from *Lanena welwitschii*.** *J. Nat. Prod.* **60**, 116-121.

Gysin, J., Crenn, Y., Da Silva, L. P., Breton, C. (1993). **Siderophores as antiparasitic agents.** Patent genius.

- Haasnoot, C. A. G., De Leeuw, F. A. A. M., Altona, C. (1980). **The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities I: An empirical generalization of the Karplus equation.** *Tetrahedron* **36**, 2783-2792.
- Herz, W., Kulanthaivel, P. (1985). **Diterpenes and sesquiterpene lactones from *Mikania congesta*.** *Phytochem.* **24**, 1761-1768.
- Herz, W., Subramaniam, P. S., Santhanam, P. S., Aota, K., Hall, A. L. (1970). **Structure elucidation of sesquiterpene dilactones from *Mikania scandens*.** *J. Org. Chem.* **35**, 1453-1464.
- Hoarau, C., Pettus, T. R. R. (2006). **General Synthesis for Chiral 4-Alkyl-4-hydroxycyclohexenones.** *Org. Lett.* **8**, 2843-2846.
- Hopkins, D. M. (1959). **Cenozoic History of the Bering Land Bridge.** *Science* **129**, 1519-1528.
- Hurault, J. M., Grenand F. P. (1998). *Indiens de Guyane, Wayana et Wayampi de la forêt.* . Autrement, Paris.
- Iglesias, E. (1991). *Las plantas y el hombre.* Abya-Yala, Quito.
- Iglesias, G. (1985). *Hierbas medicinales de los Quichuas del Napo.* Abya-Yala, Quito.
- Iglesias, G. (1989). *Sacha Jambi: El uso de las plantas en la medicina tradicional de los quichuas del Napo.* MLAL, Quito.
- Inhorn, M. C., Brown, P. J. (1997). **The Anthropology of Infectious Disease: International Health Perspectives.** *An. Rev. Anth.* **19**, 89-117.
- Jossang, A., Cave, A., Saez, J., Bartoli, M.H., Jossang, P. (1996). **Two highly populated conformations at room temperature of monterine and granjine, antitumor bisbenzylisoquinoline alkaloids: origin and tridimensional structures.** *J. Org. Chem.* **61**, 3023-3030.
- Kanyinda, B., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M. (1996). **Two new secobisbenzylisoquinoline alkaloids from the leaves of *Anisocycla jollyana*.** *J. Nat. Prod.* **59**, 498-500.
- Kohn, E. (1992). **La cultura médica de los Runas de la region Amazonica Ecuatoriana.** *Hombre y ambiente* **21**, 67-68.
- Konoshima, T., Okamoto, E., Kozuka, M., Nishino, H., Tokuda, H., Tanabe, M. (1988). **Studies on inhibitors of skin tumor promotion, III. Inhibitory effects of isoflavonoids from *Wisteria brachybotrys* on Epstein-Barr virus activation.** *J. Nat. Prod.* **51**, 1266-1270.
- Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Solis, P. N., Gupta, M. P., Bienzle, U., Eich, E. (2001). **Andinermals AC, antiplasmodial constituents from *Andira inermis*.** *Phytochem.* **58**, 769-774.
- Krettli, A. U., Andrade-Neto, V. F., Brando, M. G. L., Ferrari, W. M. S. (2001). **The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**, 1033-1042.

- Krukoff, B. A., Moldenke, H. N. (1938). *Abuta*. *Brittonia* **3**, 50-71.
- Kumar, A., Katiyar, S. B., Agarwal, A., Chauhan P.M.S.(2003). **Perspective in antimalarial chemotherapy**. *Cur. Med. Chem.* **10**, 1137-1150.
- Kunitomo, J., Murakami, Y., Oshikata, M., Akasu, M., Kodama, K., Takeda, N. (1985). **O-Methyldeoxopunjabine, a secobisbenzylisoquinoline alkaloid bearing an aryl methyl group, and three other secobisbenzylisoquinoline alkaloids, O-methylpunjabine, Secocepharanthine, and Dihydrosecocepharanthine, from *Stephania Sasakii***. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 135-143.
- Kvist, L. P., Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A. (2006). **Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis**. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 390-402.
- Lambros, C., Vanderberg, J. P. (1979). **Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture**. *J. Parasitol.* **65**, 418-420.
- Lemée, A. (1955). *Flore de la Guyane française*. P. Lechevalier, Paris.
- Leonard, B. E., Sherratt, H. S. A. (1967). **Investigation of tropical medicinal plants. Pharmacological properties of alkaloids from *Pithecelobium saman* and *Strychnos toxifera***. *Trop. Sc.* **9**, 122-135.
- 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)**. *Pharma. Biol.* **37**, 69-83.
- Li, Y., Ishibashi, M., Satake, M., Chen, X., Oshima, Y., Ohizumi, Y. (2003a). **Sterol and triterpenoid constituents of *Verbena littoralis* with NGF-potentiating activity**. *J. Nat. Prod.* **66**, 696-698.
- Li, Y., Satake, M., Oshima, Y., Ohizumi, Y. (2003b). **Naphthoquinone and Iridoid with NGF-potentiating Activity from *Verbena littoralis***. *Chem. Lett.* **32**, 728-729.
- Li, Y. S., Matsunaga, K., Kato, R., Ohizumi, Y. (2001). **Verbenachalcone, a novel dimeric dihydrochalcone with potentiating activity on nerve growth factor–action from *Verbena littoralis***. *J. Nat. Prod.* **64**, 806-808.
- Licuy Yumbo, F. (1994). *Hierbas medicinales de la Selva*. Abya Yala, Quito.
- Lie Ken Jie, M. S. F., Pasha, M. K., Alam, M. S. (1997). **Synthesis and nuclear magnetic resonance properties of all geometrical isomers of conjugated linoleic acids**. *Lipids* **32**, 1041-1044.
- Lopes, N. P., Kato, M. J., Andrade, E. H., Maia, J. G., Yoshida, M., Planchart, A. R., Katzin, A. M. (1999). **Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiapi Amazon Indians**. *J. Ethnopharmacol.* **67**, 313-319.
- Maeterlinck M. (1954), *Insectes et fleurs*. nrf, Paris

- Mahmood, K., Chan, K. C., Park, M. H., Han, Y. N., Han, B. H. (1986). **An aporphinoid alkaloid from *Pseuduvaria macrophylla***. *Phytochem.* **25**, 1509-1510.
- Mansour, M. P., Holdsworth, Daniel G., Forbes, S. E., Macleod, C. K., Volkman, J. K. (2005). **High contents of 24:6(n-3) and 20:1(n-13) fatty acids in the brittle star *Amphiura elandiformis* from Tasmanian coastal sediments**. *Biochem. Syst. Ecol.* **33**, 659-674.
- Marsaioli, A. J., Magalhaes, Aderbal F., Ruveda, Edmundo A., Reis, Francisco A. M. (1980). **<sup>13</sup>C NMR analysis of some oxoaporphine alkaloids**. *Phytochem.* **19**, 995-997.
- Mejía, K., Rengifo, E. (1996). *Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana*. IIAP, Iquitos.
- Miles, D. H., Ly, A. M., Randle, S. A., Hedin, P. A., Burks, M. L. (1987). **Alkaloidal insect antifeedants from *Virola calophylla* Warb.** *J. Agr. Food Chem.* **35**, 794-797.
- Miller, R. B., Wiedenhoef, A. C., Williams, R. S., Stockman, W., Green, F. (2003). **Characteristics of ten tropical hardwoods from certified forests in Bolivia. Part II. Natural durability to decay fungi**. *Wood and Fiber Science* **35**, 429-433.
- Mohandass, C. (2005). *Bacterial Siderophores and their Biotechnological applications*. National institute of oceanography, Dona-Paula.
- Mollov, N. M., Dutchevska, H.B., Georgiev, V.St. (1971). *Thalictrum alkaloids*. Publishing house of the hungarian academy of sciences, Budapest.
- Mori, S. A., Cremers, G., Gracie, C. A. (1997). *Guide to the Vascular Plants of Central French Guiana*. New York Botanical Garden Bronx, New York.
- Nozais, J. P., Datry, A., Danis, M. (1996). *Traité de parasitologie médicale*. Pradel, Paris.
- Phillipson, J. D., Wright, C. W. (1991). **Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents?** *J. Ethnopharmacol.* **32**, 155-165.
- Pino, J. A., Rosado, A., Fuentes, V. (1997). **Composition of the leaf oil of *Eryngium foetidum* L. from Cuba**. *J. E. O. Res.* **9**, 467-468.
- Queiroz, E. F., Kuhl, C., Terreaux, C., Mavi, S., Hostettmann, K. (2003). **New Dihydroalkylhexenones from *Lanea edulis***. *J. Nat. Prod.* **66**, 578-580.
- Rodrigues, V. E. G., Carvalho, D. A. (2001). **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais**. *Rev. C. Agrotec.* **25**, 102-123.
- Roumy V., Fabre N., Souard F., Massou S., Maurel S., Valentin A., Moulis C. (2006). **Isolation and antimalarial activity of alkaloids from *Pseudoxandra cuspidata***. *Planta med.*, **72**, 894-898.
- Roumy V., Garcia-Pizango G., Gutierrez-Choquevilca A-L., Ruiz L., Jullian V., Winterton P., Fabre N., Moulis C., Valentin A. (2007). **Amazonian plants used by Peruvian Quechua and Mestizo people to treat malaria : evaluation of their activity**. *J. ethnopharmacol.*

- Rutter, R. A. (1990). *Catalogo de plantas utiles de la Amazonia Peruana*. ILV. Pucallpa.
- Sáenz, M., Gómez, M. A., Fernández, M. A. (1999). **Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation Models.** *Phytother. Res.* **13**, 78-80.
- San Sebastian, M. (1995). *Nucanchic janpi, tratamientos con plantas medicinales de los Naporunas*. CICAME, Napo.
- Sauvain, M. (1989). **Etudes de plantes anti-parasitaires du plateau des Guyanes en Amazonie : antipaludiques et antileishmaniens.** Paris Sud, Paris.
- Senior, K. (2001). **Molecular genetics helps to probe the history of malaria.** *Lancet Infect. dis.* **1**, 5-6.
- Sereno, D., Lemesre, J. L. (1997). **Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 972-976.
- Shamma, M. (1972). *The Isoquinoline Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, London.
- Shepard, G. H. (1999). **Pharmacognosy and the Senses in Two Amazonian Societies.** University of California. Berkeley.
- Shepard, G. H. (2004). **A sensory ecology of medicinal plant therapy in two amazonian societies.** *Am. Anth.* **106**, 252-266.
- Sherman, I. W. (1998). *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*. ASM Press, Washington.
- Silverstein, R.M., Basler, G.C., Morill, T.C. (1998) *Identification spectrométrique de composés organiques* G. DeBoeck univesité, Paris.
- Steele, J. C. P., Phelps, R. J., Simmonds, M. S. J., Warhurst, D. C., Meyer, D. J. (2002). **Two novel assays for the detection of haemin-binding properties of antimalarials evaluated with compounds isolated from medicinal plants.** *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 25.
- Steele, J. C. P., Simmonds, M. S. J., Veitch, N. C., Warhurst, D. C. (1999). **Evaluation of the anti-plasmodial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*.** *Planta Med.* **65**, 413-416.
- Suffness, M., Abbott, B., Statz, D., Wonilowicz, E., Spjut, R. (1988). **The utility of P388 leukemia compared to B16 melanoma and colon carcinoma 38 for in vivo screening of plant extracts.** *Phytother. Res.* **2**, 89-97.
- Tadic, D., Cassels, Bruce K., Leboeuf, M., Cave, A. (1987). **Kinabaline and the aporphinoid biogenesis-of azaanthracene and azafluorene alkaloids.** *Phytochem.* **26**, 537-541.
- Thinapong, P., Rangsiman, O., Tuchinda, P., Munyoo, B., Pohmakotr, M., Reutrakul, V. (2000). **9,10-Dimethoxy-4-methyl-1,2-di-hydro-1-azaanthracen-2-one (kalasinamide), a new azaanthracene alkaloid.** *Acta Cryst. Section C-Cryst. Struct. Commun.* **56**, E309-E310.

- Trager, W., Jensen, J. B. (1976). **Human malaria parasites in continuous culture.** *Science* **193**, 673-675.
- Tshibangu, J. N., Wright, A.D., König; G.M. (2003). **HPLC isolation of the anti-plasmodially active bisbenzylisoquinoline alkaloids present in root of *Cissampelos mucronata*.** *Phytochem. Anal.* **14**, 13-22.
- Tuchinda, P., Pohmakotr, M., Munyoo, B., Reutrakul, V., Santisuk, T. (2000). **An azaanthracene alkaloid from *Polyalthia suberosa*.** *Phytochem.* **53**, 1079-1082.
- 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*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2305-2307.
- Valentin, A., Le Guennec, R., Rodriguez, E., Reynes, J., Mallie, M., Bastide, J. M. (1996). **Comparative resistance of *Candida albicans* clinical isolates to fluconazole and itraconazole in vitro and in vivo in a murine model.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1342-1345.
- Van Huysen, W., Rieckmann, K. H. (1993). **Disposable environmental chamber for assessing the drug susceptibility of malaria parasites.** *Trop. Med. Parasitol.* **44**, 329-330.
- Watson, L., Dallwitz, M. J. (1992). *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval.* Delta-Inkey, New York.
- Wendt, T., Mitchell, J. D. (1995). **A New Species of *Tapirira* (Anacardiaceae) from the Isthmus of Tehuantepec, Mexico.** *Brittonia* **47**, 101-108.
- Willcox, M., Rasoanaivo, P., Bodeker, G. (2004). *Traditional Medicinal Plants and Malaria.* CRC Press, London.
- Wood, C. S., Angel, J. L., Brues, A. M., Clabeaux, M. S., Durbin, T. E., Goldstein, M. S., Hall, R. L., Hoffman, J. M., Livingstone, F. B., Mc Cracken, R. D. (1975). **New evidence for a late introduction of malaria into the New World.** *Cur. A.* **16**, 93-104.
- Yeh, P. (1974). **Essential oils. XVI. Oil of *Eryngium foetidum*.** *J.C. Chem. Soc.* **21**, 139-147.
- Yotoko, K. S. C. (2006). **Malaria parasites (Apicomplexa, Haematozoa) and their relationships with their hosts: is there an evolutionary cost for the specialization?** *J. Zoo. Syst. Evo. Res.* **44**, 265.
- Youngken, J., Tashiro, J. T. (1970). **Survey of plants for antimalarial activity.** University, Rhode Island.

# H MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 1. Matériel et méthodes appliqués à la phytochimie

### 1.1. Méthodes chromatographiques analytiques

#### 1.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince sont employées dans le suivi des purifications et permettent de vérifier la présence et le degré de pureté des produits étudiés.

Ces analyses sont réalisées en phase normale sur plaques d'aluminium recouvertes de silice (Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck) et déshydratées à l'étuve. Certaines de ces plaques de silice sont préalablement trempées dans une solution d'acétate de sodium (0,7 N) ou de nitrate d'argent (70 g/l) afin d'optimiser la résolution de la séparation (pour les alcaloïdes de *P. cuspidata* ou les composés alkylés de *T. guianensis*). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre contenant l'éluant approprié. Les phases mobiles sont constituées d'un mélange tertiaire de solvants aux proportions variables :

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Diéthylamine (DEA) pour *P. cuspidata*

Tol/AcOEt/MeOH pour *T. guianensis*

Les CCM sont analysées en lumière visible et sous U.V. (254 et 356 nm), avant et après révélation par les réactifs appropriés. L'utilisation de différents réactifs permet de comparer les profils des fractions séparées et de les rassembler en fonction de leurs similitudes. Les principaux réactifs utilisés sont :

**Réactif à la vanilline sulfurique**, révélateur polyvalent

Solution composée de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique et d'éthanol à 95% q.s.p. 100 ml. Après pulvérisation, la plaque est chauffée à l'étuve quelques minutes à 110°C.

Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composé.

**Réactif de Dragendorff**, révélateur d'alcaloïdes (majoritairement)

La solution A est composée de 0,85 g de nitrate basique de bismuth et 10 g d'acide tartrique dissous dans 40 ml d'eau ; la solution B contient 16 g de KI dans 40 mL d'eau (solution B). Ces deux solutions sont mélangées extemporanément : 5 mL de A + 5 mL de B dans 100 mL d'eau et 20 g d'acide tartrique.

### **1.1.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)**

Les analyses CL/DAD-UV ont été effectuées à l'aide d'une chaîne CLHP Merck Hitachi Lachrom munie d'une pompe Lachrom 7100 et d'un détecteur UV à barrettes de diodes Merck Hitachi Lachrom 7455 piloté par le logiciel D-7000 HSM (Merck).

Les chromatogrammes de *T. guianensis* ont été réalisés en phase inverse sur une colonne HPLC de type LiChrospher RP-18 (Merck) (5 µm, 250 x 4,5 mm) avec un gradient MeCN/H<sub>2</sub>O et un débit fixé à 1 ml/min.

Les CLHP analytiques et préparatives réalisées sur les fractions issues de *P. cuspidata* ont été effectuées sur des colonnes en phase inverse X-terra RP18 (Varian) 10 µm, 1,9 x 25 cm et 5 µm, 0,46 x 25 cm avec des phases mobiles composées de MeCN et d'eau tamponnée à pH : 9,5 (HCO<sub>3</sub>Na/NH<sub>4</sub>OH).

## **1.2. Méthodes chromatographiques préparatives**

Les supports les plus utilisés sont des silices en phase normale (parfois inversée), traitées par de l'acétate de sodium (1g d'acétate de sodium/20g de silice ; permettant une meilleure résolution dans la séparation des alcaloïdes) ou traitées par du nitrate d'argent (2g Ag NO<sub>3</sub>/20g de silice ; pour purifier des composés à chaîne carbonée insaturée). Les sels sont ensuite éliminés par extraction liquide/liquide (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O).

### **1.2.1. Chromatographie sur plaque préparative**

Ce type de séparation est utilisé pour la purification des composés **2** et **3** issus de *T. guianensis*.

Les plaques préparatives (silica gel 60, F<sub>254</sub>, 0,2 x 20 x 20 cm, Merck) sont traitées au nitrate d'argent (par trempage et évaporation à l'étuve) puis développées dans l'obscurité avec un mélange Tol/AcOEt/MeOH (5/82/13). Le dépôt de 30 mg d'échantillon est effectué par un déposeur automatique (Camag automatic TLC sampler 4).

### 1.2.2. Chromatographie sur colonne ouverte

Plusieurs types de phases sont mis en œuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. La gravité étant la seule force de migration, ce type de chromatographie est long et employé pour des phases stationnaires de type Sephadex LH 20 (chromatographie d'exclusion) ou parfois pour de la silice (SDS 60 Å 70-200 µm préalablement activée à l'étuve). La quantité de phase stationnaire utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner peut être déposé en phase liquide concentrée (dans un solvant peu éluant) ou en phase solide (adsorption sur silice).

### 1.2.3. Chromatographie liquide moyenne pression

La chromatographie liquide sous moyenne pression permet de réaliser des séparations de bonne résolution avec un débit élevé. Elle est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique (Büchi 688), sur colonnes de chromatographie en verre (Büchi) contenant de la silice SDS 60 Å 6-35 µm (SDS, Peypin) en phase normale (préalablement activée quelques heures à l'étuve), ou de la silice en phase inverse de type C18 90 Å 40-60 µm (AIT, Le Mesnil le Roy). D'autres colonnes plus simple d'emploi et de calibres variables sont également utilisées. Ces colonnes sont surmontées d'un ballon réservoir contenant l'éluant qui est poussé par pression d'air à travers la phase stationnaire. Lors de l'utilisation de silice traitée au nitrate d'argent, la paroi externe des colonnes est entourée de papier aluminium, empêchant ainsi l'oxydation du support par la lumière.

L'échantillon est introduit sous forme solide mélangé à la phase stationnaire ou sous forme liquide suivant sa solubilité. Les systèmes d'éluant employés sont généralement des mélanges binaires ou ternaires monophasiques souvent en gradient de polarité, ex. :

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (pour *P. cuspidata*)

Tol/AcOEt/MeOH (pour *T. guianensis*)

### 1.2.4. Chromatographie par élution sous basse pression

Ce dispositif est constitué d'une cartouche contenant la phase stationnaire (silice ou silice greffée en C<sub>18</sub>, de 6 ou 60 mL, 20 - 80 µm, Mega bond elut, Varian), connectée par son extrémité inférieure à une cuve de collecte sous basse pression (VAC ELUT SPS 24,

Analytichem International). Cette technique chromatographique est utilisée pour purifier les composés issus de *T. guianensis* à l'aide de différentes phases mobiles :

MeOH/H<sub>2</sub>O sur phase stationnaire de silice greffée en C<sub>18</sub>

Tol/AcOEt sur phase stationnaire de silice

### 1.2.5. Chromatographie de partage centrifuge

Le fractionnement des extraits est effectué grâce à un appareil FCPC Chromaton muni d'un rotor de 200 ml réglé à la vitesse de rotation de 1700 tours/min. La phase stationnaire est constituée de la phase supérieure du mélange tertiaire But/Hept/MeCN (22/35/45), la phase inférieure constituant la phase mobile est délivrée par une pompe Varian PS. L'élution se fait en mode descendant à un débit de 9 ml/min pendant trois heures, puis le mode est inversé afin d'éluer les composés restés dans la phase stationnaire. Les fractions ont été recueillies par un collecteur automatique Varian PS et regroupées selon l'analyse par CCM.

Cette méthode a été appliquée sur l'extrait brut CHCl<sub>3</sub> de *T. guianensis* (300 mg), permettant son partage en sept fractions nettement distinctes.

### 1.2.6. Chromatographie circulaire centrifuge

La chromatographie circulaire centrifuge est réalisée au moyen d'un appareil de type Chromatotron modèle 7924 pour la purification des alcaloïdes de *P. cuspidata*. Les plaques de chromatographie circulaire (2 mm de silice sur plaque de verre circulaire) sont préparées avec de la silice 60 PF<sub>254</sub> (mélange de silice 40-100 µm avec 20 % CaSO<sub>4</sub>) et une solution aqueuse suivant le protocole décrit ci-dessous :

- mélanger 125 mL d'eau avec 45 g de silice 60 PF<sub>254</sub> et 1,5 g d'acétate de sodium
- placer ce mélange pâteux dans une cuve à ultrasons 10 min puis sous vide (10 min) afin de dégazer l'ensemble
- étaler le mélange sur le support en verre circulaire et évaporer le surplus d'humidité sous vide (6 h)
- enfin, activer le disque de silice traitée quelques heures à l'étuve.

L'extrait à chromatographier est déposé sur le centre de la plaque tournante à l'aide d'une pompe péristaltique qui injecte ensuite le solvant d'élution (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 20/80). La migration centrifuge des composés est observée sous UV à travers un couvercle en quartz. Les produits sont élués à la périphérie de la plaque et récupérés dans une rigole bordant le disque.

### **1.2.7. Chromatographie liquide haute performance semi-préparative (CLHP semi-préparative)**

Le dispositif de CLHP semi-préparative est constitué de deux pompes Varian PS 218, d'un détecteur UV DAD (Hitachi), d'un enregistreur Varian Star et d'un collecteur de fractions Varian PS 701.

Les séparations ont été réalisées sur colonne XTerra RP18 (Waters) (10  $\mu\text{m}$ , 1,9 x 25 cm et 5  $\mu\text{m}$ , 0,46 x 25cm) en utilisant une précolonne. La phase éluante employée pour séparer les alcaloïdes de *P. cuspidata* est MeCN/H<sub>2</sub>O tamponné à un pH de 9,5 (HCO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> et NH<sub>4</sub>OH) .

## **1.3. Méthodes analytiques**

### **1.3.1. Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D$**

Le pouvoir rotatoire des molécules isolées est mesuré sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ) dans une cuve de 10 cm à température ambiante.

### **1.3.2. Spectrophotométrie ultraviolet (UV)**

Le spectre UV des composés est mesuré en solution (CHCl<sub>3</sub>, MeOH ...) à l'aide d'un spectrophotomètre de type Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 20, double faisceau. Les mesures sont effectuées dans des cuves de quartz à trajet optique de 1 cm.

### **1.3.3. Spectrophotométrie infra-rouge (IR)**

Le spectre infra-rouge des molécules est mesuré au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer Paragon 1000 FT-IR sur des pastilles de KBr.

### **1.3.4. Spectrométrie de masse (MS)**

Différentes sources et modes d'ionisations sont utilisés : l'électrospray (ESI), l'impact électronique (IE) (le plus souvent dans l'acétonitrile), l'ionisation chimique sous pression atmosphérique (APCI)...

Les spectres de masse haute résolution sont effectués en électrospray sur un appareil Q-Tof Ultima (Waters).

### **1.3.5. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les spectres de résonance magnétique nucléaire sont enregistrés sur un appareil de type Bruker Avance 300 (fréquences de 300 ( $^1\text{H}$ ) et 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ )), ou Bruker Avance 500 avec cryosonde (fréquences de 500 ( $^1\text{H}$ ) et 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ )) selon la quantité de produit à analyser et la résolution souhaitée. Les expériences bidimensionnelles de routine réalisées sont : COSY, TOCSY, HSQC, NOESY, ROESY et HMBC. Les analyses bidimensionnelles écho-anti-écho ADEQUATE ( $^{13}\text{C}$  DQ  $^1\text{H}$ ) sont effectuées sur un spectromètre Bruker avance 600 MHz avec cryosonde. Les échantillons sont solubilisés dans les solvants deutérés  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  et  $\text{DMSO-}d_6$  (Euriso-top, Gif sur Yvette) dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

### **1.3.6. Pesées des échantillons**

Deux types de balance ont été utilisés lors de ces travaux selon le poids des échantillons. Il s'agit des balances PJ Precisa junior 500 c (de 0,1 à 500 g) et Roucaire HR-200 (de 0.1 mg à 200 g).

## 2. Matériel et méthodes appliqués à la biologie

Les tests d'activité biologique concernent *Plasmodium falciparum*, *Leishmania amazonensis*, certaines bactéries et champignons ainsi que des lignées cancéreuses.

L'estimation de l'activité anti-parasitaire d'une drogue repose sur l'évaluation de deux paramètres : son activité anti-parasitaire et sa cytotoxicité. Le rapport de ces deux paramètres correspond à l'index de sélectivité de l'échantillon ( $IS = CI_{50} \text{ cytotoxicité} / CI_{50} \text{ anti-parasitaire}$ ). Cet index doit être le plus élevé possible, garantissant ainsi le « *primum non nocere* ».

### 2.1. Tests réalisés sur *Plasmodium falciparum*

#### 2.1.1. Activité *in vitro*

##### 2.1.1.1. 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, Cambrex) enrichi de 10 % de sérum humain AB+ (Etablissement Français du Sang) et de L-glutamine (acide aminé essentiel). 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 dans un air humidifié et enrichi en CO<sub>2</sub> (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).

### **2.1.1.2. La synchronisation** (Lambros, Vandeberg, 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 en anneaux, alors que les lysats cellulaires sont en suspension.

### **2.1.1.3. Evaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro***

L'inhibition de la schizogonie érythrocytaire (à *P. falciparum*) peut être mesurée suivant deux manières :

- par détection spectrophotométrique (LDH)
- par détection de radioactivité (Hypoxanthine tritiée)

#### **Méthode biochimique (LDH)**

#### Principe

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le métabolisme du glucose aboutissant à la production de l'énergie nécessaire aux cellules. La LDH plasmodiale métabolisant 20 à 25 fois plus de substrat que le globule rouge (car les besoins énergétiques du parasite sont très élevés), la quantification de l'activité de cette enzyme est directement proportionnelle au développement du parasite.

La LDH, dernière enzyme de la glycolyse, assure la régénération du nicotinamide adenine-dinucléotide (NAD) utilisé dans la production d'ATP (forme de stockage énergétique). La LDH parasitaire (pLDH), ainsi que la LDH érythrocytaire utilisent le NAD pour transformer le lactate en pyruvate. Cette réaction a lieu en présence d'un coenzyme,

l'acétylpyridine adénine dinucléotide (APAD) spécifique de la LDH parasitaire. Ce coenzyme se réduit au cours de la réaction et pourra retrouver sa forme oxydée en réduisant un autre substrat, le NBT, (*Nitro Blue Tetrazolium*) qui est un indicateur coloré. Le NBT alors oxydé se caractérise par une couleur bleue et une absorption maximum à 650 nm. L'analyse spectrophotométrique à 650 nm des puits de culture, nous permet de mesurer une absorbance proportionnelle à la parasitémie.

#### Mode opératoire

Les tests sont réalisés sur des plaques à 96 puits remplis d'un volume fixe d'hématies parasitées (parasitémie de 1,0 % et hématocrite de 1,5 %). Les fractions à tester (à différentes concentrations) sont alors additionnées en *triplicata* dans les puits. Après 48 h d'incubation, les plaques sont congelées à - 20 °C permettant l'hémolyse des cellules et la libération de la LDH dans le milieu. Après décongélation, les différents substrats et coenzyme sont alors ajoutés pour un volume de 100 µl (Na L-lactate : 2 mg, APAD : 0,37 mg avec du tampon Tris : 0,55 mg et triton : 0,13 µl). Après 30 min à température ambiante, 25 µl de NBT + PES sont ajoutés dans chacun des puits, et la densité optique est mesurée à 650 nm (sur un appareil de type polastar).

### **Méthode radioisotopique (hypoxanthine tritiée)**

#### Principe

*Plasmodium 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  $\beta$ ), 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. Comparativement à la technique utilisant la LDH, la technique par radio marquage est plus sensible car les globules rouges ne synthétisent pas d'ADN et d'ARN et ne produisent donc pas de signaux interférants.

#### Mode opératoire

Le mode opératoire est similaire à celui du test LDH concernant la préparation des plaques. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, l'hypoxanthine tritiée est ajoutée à raison de 0,25 µCi/puits (Perkin Elmer à 1 µCi/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 (4<sup>ème</sup> jour), 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) est alors mesurée par un compteur  $\beta$  ( $\beta$  Scint, Perkin Elmer).

### **Détermination de la CI<sub>50</sub>**

La CI<sub>50</sub> (concentration de l'échantillon qui inhibe 50% de la croissance du parasite) est déterminée par interpolation linéaire, à l'aide du rapport de la courbe d'activité sur le logarithme des concentrations des échantillons.

## **2.1.2. Tests *in vivo***

### Principe

Il s'agit du test de « Peters ». Il consiste à infecter des souris par une souche de *Plasmodium vinckei petteri* puis à les traiter deux heures plus tard et une fois par jour pendant 3 jours.

### Méthode

Des prélèvements sanguins issus de souris parasitées (atteignant de hautes parasitémies), sont inoculés à des souris saines par voie intra-péritonéale (inoculation de 100  $\mu$ l de sang parasité à 10<sup>7</sup> parasites/ml ; la parasitémie est estimée sur plaque de Neubauer).

Suite à l'inoculation du parasite, plusieurs lots de souris parasitées sont constitués : celles recevant le traitement témoin à la chloroquine (1mg/kg ou 10 mg/kg : 2 x 5 individus), d'autres traitées par l'échantillon à tester (5 individus) et enfin un groupe témoin auquel n'est inoculé qu'une solution sans principe actif (mélange de DMSO avec du milieu, pour 10 individus).

Ces inoculations sont quotidiennes pendant quatre jours, puis des frottis sanguins (prélèvement au niveau de la queue) sont effectués pour évaluer les parasitémies au 5<sup>ème</sup> jour. Les souris survivantes sont sacrifiées le 15<sup>ème</sup> jour.

## **2.2. Tests *in vitro* réalisés sur *Leishmania amazonensis***

### **2.2.1. Culture axénique de *Leishmania amazonensis***

La culture axénique correspond à la forme amastigote maintenue à l'état libre (hors du macrophage humain). La culture de cette forme est donc rendue plus simple.

Le milieu nutritif est composé de MAA/20 de pH = 6,4 (Milieu de croissance Axénique pour Amastigote : Brevet PCT/FR94/00577). Ce milieu est préparé à partir du milieu modifié 199 (Gibco BRL) supplémenté avec 0,5% tripto caséine soja, 15 mM D-Glucose, 5 mM de L-Glutamine, 25 mM d'HEPES, 4 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,023 mM d'hémine et 20 % de sérum bovin fœtal (SVF). Les amastigotes et le milieu sont introduits dans une flasque de culture, puis placés dans un incubateur maintenu à 32 °C dans un air humidifié et enrichie en CO<sub>2</sub> (5%). Dans ces conditions, décrites par Sereno, la population initiale est multipliée par 100 en une semaine sans modification morphologique de la forme amastigote (ovoïde et non flagellée).

### **2.2.2. Evaluation de l'activité leishmanicide *in vitro***

Les parasites sont déposés sur une plaque de 96 puits, à raison de 10<sup>5</sup> cellules par puits de 90 µl. 10 µl d'échantillon à tester sont alors additionnés en *triplicata* dans les puits (pour des concentrations finales de 0,1 ; 1 ; 10 et 100 µg/ml) ainsi que l'amphotéricine B pour les témoins. Les plaques ainsi préparées sont mises à incuber à 32 °C durant 48 h, puis l'hypoxanthine radiomarquée est incorporée (0,25 µCi/puits). Les plaques sont alors remises à incuber pendant 24 h puis congelées (à -70°C) avant la lecture de la radioactivité. Après décongélation, les acides nucléiques sont collectés sur filtre à l'aide d'un collecteur de cellules automatique. La radioactivité déposée sur le filtre est mesurée par un compteur β. La CI<sub>50</sub> est déterminée comme précédemment (pour *Plasmodium falciparum*).

## **2.3. Tests *in vitro* réalisés sur bactéries et champignon**

Evaluation des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et CMB ou CMF (Concentration Minimale Bactéricide ou Fongicide) par microméthode.

### **2.3.1. Principes**

#### **2.3.1.1. Mesure des CMI**

Le principe de cette mesure est simple, il consiste en plusieurs étapes :

- dilutions successives des échantillons sur microplaque (sauf pour les colonnes de témoins positifs et négatifs)

- suspension du germe dans tous les puits d'une seconde microplaque (sauf pour la colonne du témoin négatif)
- ensemencement de la première microplaque avec les germes de la seconde microplaque
- lecture après 36 h d'incubation (selon les souches) ; la CMI est atteinte dans les puits ou le milieu de culture reste limpide.

### **2.3.1.2. Mesure des CMB ou des CMF**

- Repiquage sur gélose des puits encadrant la CMI.
- Incubation de 24 h (selon les souches).
- Lecture par transparence à travers la boîte de gélose : si la colonie bactérienne ne s'est pas développée, la gélose reste limpide.

## **2.3.2. Modes opératoires**

### **2.3.2.1. Méthode de mesure des CMI**

100 µl de milieu de culture sont déposés dans tous les puits de la première microplaque et 100 µl d'échantillon (à 500 µg/ml avec moins de 10 % de DMSO) sont ajoutés dans le premier puits. Puis une série de dilutions successives (au 1/2) est effectuée sur toute la ligne (sauf pour les témoins). Ces dilutions sont dupliquées et effectuées dans du bouillon tryptone sel (MRD-F).

La seconde microplaque, dont les puits contiennent 100 µl de milieu ensemencé sauf pour le témoin négatif (stérile), permet, par transfert avec un enseigneur multipoint, d'introduire le germe dans les puits de la première microplaque. Le milieu employé est du bouillon tryptone de soja (TSB-F) pour les bactéries, et Sabouraud pour les champignons.

Après 36 h d'incubation à 30° C pour les champignons, ou 35° C pour les bactéries, la lecture de la CMI est faite par simple regard au travers de la microplaque. La CMI est la plus petite concentration avec absence de croissance visible ; elle correspond au premier puits resté limpide.

### **2.3.2.2. Méthode de mesure des CMB ou CMF**

La plaque ayant servi à la mesure de la CMI est repiquée grâce à un enseigneur multipoint vers une boîte de gélose. Cela permet, après incubation (24 h selon le germe), de repérer l'absence de germes dans certains puits de la microplaque précédente et de

déduire les concentrations minimales en principe actif pouvant totalement détruire le germe.

La CMB et la CMF sont les plus petites concentrations avec absence de croissance visible ; elles correspondent aux premiers dépôts sur gélose qui ne se sont pas développés.

## 2.4. Mesure de la cytotoxicité

Il s'agit de mesurer la cytotoxicité d'échantillons sur des cellules MCF7 (cellules mammaires cancéreuses). La méthode utilisée repose sur l'estimation de l'inhibition de la prolifération des cellules soit par spectrophotométrie, soit par radio-marquage.

### 2.4.1. Principe

**Test LDH :** Le principe repose sur la transformation enzymatique d'un sel de tétrazolium appelé XTT (sodium 2,3 Bis (2-méthoxy-4-nitro-5 sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanolide). Ce XTT est réduit par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes, en présence du coenzyme Q ; il se forme un composé hydrosoluble orangé qui est dosable par spectrophotométrie à 450 nm.

**Test <sup>3</sup>H-hypoxanthine :** Le principe est le même que pour l'évaluation *in vitro* de la parasitémie à *Plasmodium falciparum*, mais ici, l'hypoxanthine est incorporée par des cellules humaines.

### 2.4.2. Mode opératoire

Les cellules sont comptées sur une cellule de Malassez (plaque de microscope quadrillée). La culture estensemencée dans une plaque 96 puits à raison de 40 000 cellules par puits dans 200 µl de milieu.

- **Détection par spectrophotométrie :** les plaques sont mises dans l'incubateur (24 h à 37 °C, air humidifié, 5 % CO<sub>2</sub>). Le 2<sup>ème</sup> jour, les échantillons sont ajoutés au milieu (DMEM) à différentes concentrations (0,1 ; 1 ; 10 et 100 µg/ml), puis les plaques sont mises à incuber pendant 48 heures. Au 4<sup>ème</sup> jour, le XTT et le coenzyme Q sont ajoutés puis les plaques sont mises à incuber pendant 3 heures de plus. La réaction est alors arrêtée par ajout de SDS à 10 % et l'absorbance de chaque puits est mesurée à 450 nm.

- **Détection radioisotopique** : les cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que les globules rouges parasités *in vitro* par *P. falciparum*, à l'exception du sérum humain qui est remplacé par du sérum bovin (5%). Les échantillons sont ajoutés à différentes concentrations (0,1 ; 1 ; 10 et 100 µg/ml) au milieu additionné d'hypoxanthine tritiée. La lecture de la radioactivité est faite après 48 h d'incubation de la même manière que pour *Plasmodium falciparum*. L'incorporation de l'hypoxanthine par les cellules traitées (par la doxorubicine ou par les échantillons) est comparée à celle des cellules non traitées qui se sont normalement multipliées au cours de ces 48 h. La comparaison des courbes (radioactivité en fonction de la concentration d'échantillon) permet d'établir les CI<sub>50</sub>.

# I PUBLICATIONS

## En révision

**Four New Anti-protozoal and Anti-bacterial Compounds from *Tapirira guianensis* Aubl.**  
Roumy V., Fabre N., Portet B., Acebey L., Valentin A., Moulis C. *Phytochemistry*.

## Isolation and Antimalarial Activity of Alkaloids from *Pseudoxandra cuspidata*

Vincent Roumy<sup>1</sup>  
Nicolas Fabre<sup>1</sup>  
Florence Souard<sup>1</sup>  
Stéphane Massou<sup>2</sup>  
Geneviève Bourdy<sup>1</sup>  
Séverine Maurel<sup>1</sup>  
Alexis Valentin<sup>1</sup>  
Claude Moulis<sup>1</sup>

### Abstract

A novel and very unusual azaanthracene alkaloid, 1-aza-7,8,9,10-tetramethoxy-4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroanthracene (**1**) and a new diastereoisomer of the bis-benzylisoquinoline alkaloid rodiasine, 1S,1'R-rodiasine (**2**), as well as the alkaloids O-methylpunjabine (**3**) and O-methylmoschatoline (**4**) have been isolated from *Pseudoxandra cuspidata* bark, used in French Guiana as an antimalarial. Their structures were elucidated by spectroscopic analyses, especially 2D-NMR techniques (ADEQUATE and NOESY). We found that the antimalarial activity of this bark was mostly

due to bis-benzylisoquinoline 1S,1'R-rodiasine (**2**) ( $IC_{50} = 1 \mu M$ ) also displaying a low cytotoxicity.

### Key words

*Pseudoxandra cuspidata* · Annonaceae · alkaloids · azaanthracene · bis-benzylisoquinoline alkaloids · aporphine alkaloids · *Plasmodium falciparum* · MCF-7 cells

Supporting information available online at

<http://www.thieme-connect.de/ejournals/toc/plantamedica>

### Introduction

Malaria remains one of the most important diseases in tropical developing countries. Over 3 billion people live under the threat of malaria and over a million are killed every year – mostly children [1]. Despite international commitment to control this plague and the effort put into research, reality for many people is much as it was years ago: patients still die because they are unable to get access to treatment for economic reasons and, often, drug effectiveness is impaired due to parasite resistance. In this context, safe, affordable and effective new drugs against resistant strains of *Plasmodium* are desperately needed. Discovery of new antimalarial drugs is partly based on natural product analysis from traditional medicines, which may lead to new compounds, such as, for example, artemisinin in *Artemisia annua*

[2]. Many plant preparations are used all over the world as antimalarials or febrifuges, but have been poorly studied.

In 2002, an ethnopharmacological study, centered on local antimalarial treatments, was performed in French Guiana. Among the remedies used by the population, the *Pseudoxandra cuspidata* Maas (Annonaceae) bark of the tree, in the form of a decoction, was mentioned as a good antimalarial. This traditional preparation was evaluated *in vitro* for blood schizonticidal activity on *Plasmodium falciparum* (concentration inhibiting 50% of parasite growth:  $IC_{50} = 7 \text{ mg/mL}$ ) and *in vivo* against *Plasmodium yoelii* in rodents [3].

*P. cuspidata* bark was chosen for bio-assay-guided fractionation because of its good antimalarial potential and because no pre-

### Affiliation

<sup>1</sup> Laboratoire Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox, UMR 152 IRD, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse, France

<sup>2</sup> Structure Fédérative Toulousaine en Chimie Moléculaire, FR 2599, Service de R.M.N., Université Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, France

### Correspondence

Dr. Nicolas Fabre · Laboratoire Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox · UMR 152 IRD · Université Toulouse 3 Paul Sabatier · Faculté des Sciences Pharmaceutiques · 31062 Toulouse Cedex 9 · France · Phone: +33-5-62-25-68-48 · Fax: +33-5-61-55-43-30 · E-mail: nfabre@cict.fr

Received February 3, 2006 · Accepted June 1, 2006

### Bibliography

Planta Med 2006; 72: 894–898 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York  
DOI 10.1055/s-2006-947184 · Published online August 10, 2006  
ISSN 0032-0943

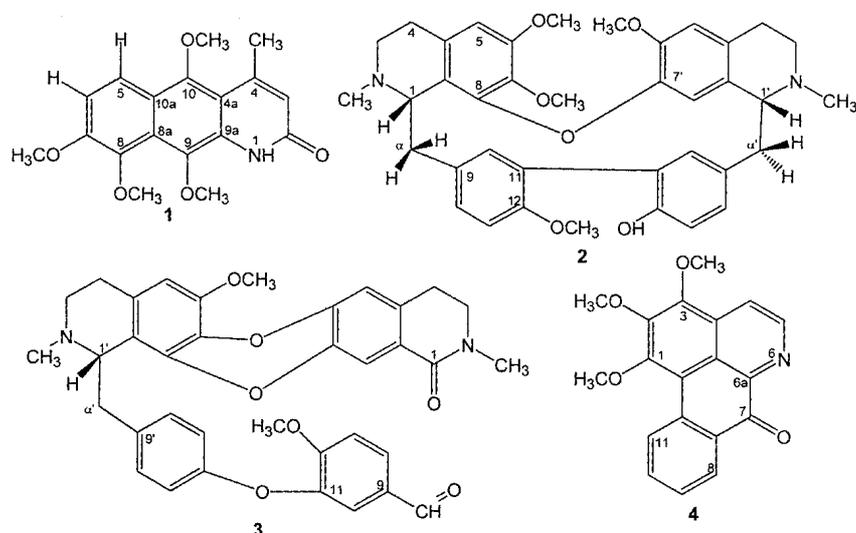


Fig. 1 Bioactive compounds from *Pseudoxandra cuspidata* Maas (Annonaceae).

vious work had been undertaken on this particular species. We report here the antimalarial bioassay-guided fractionation of *P. cuspidata* bark, leading to the isolation and identification of a bis-benzylisoquinoline (**2**) as an active principle. Three other alkaloids were also isolated and evaluated (see Fig. 1), particularly a novel and unusual 1-aza-7,8,9,10-tetramethoxy-4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroanthracene alkaloid (**1**).

## Materials and Methods

### Instrumentation

Optical rotation was measured on a Perkin-Elmer 241 polarimeter with a sodium lamp ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ) in a 10 cm microcell. IR spectroscopy (in KBr) was performed on a Perkin-Elmer Paragon 1000 FT-IR spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance II 500 spectrometer equipped with a TBI z-gradient 5 mm probe. 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) and 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) NMR experiments were performed at 298 K using standard pulse sequences. A 2D echo-antiecho ADEQUATE spectrum ( $^{13}\text{C}$  DQ,  $^1\text{H}$ ) was acquired on a Bruker Avance II 600 spectrometer equipped with a TXI cryogenic cooled probe. 100% deuterated chloroform (Eurisotop; Gif-sur-Yvette, France) was used as solvent. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm and coupling constants ( $J$ ) are reported in Hz. ESI-MS (positive ion mode) spectra, 3.5 kV (MeOH- $\text{CH}_3\text{CN}$  1:1), were recorded on a Perkin-Elmer Sciex API 365 mass spectrometer. HR-ESI-MS spectra (positive ion mode) were recorded on a Q-ToF Ultima (Waters; Milford, MA, USA) apparatus. Column chromatography: silica gel 60 SDS 70–200  $\mu\text{m}$  (SDS; Peypin, France). Medium-pressure column chromatography: silica gel 60 SDS 6–35  $\mu\text{m}$  (SDS). Reversed-phase chromatography: Mega Bond Elut  $\text{C}_{18}$  cartridge (Varian Chromatography; Walnut Creek, California, USA). Preparative and analytic HPLC were performed using X-terra RP18 columns (Varian Chromatography): 10  $\mu\text{m}$  1.9  $\times$  25 cm i.d. and 5  $\mu\text{m}$  0.46  $\times$  25 cm i.d., respectively, with a UV DAD Hitachi L 7455 as detector. Fractionations were monitored by TLC (silica gel 60 F-254; Merck; Darmstadt, Germany, treated with sodium acetate) with visualization under UV (254 and 365 nm) and Dragendorff reagent. All solvents were spectral grade or distilled from glass prior to use.

### Plant material

*Pseudoxandra cuspidata* Maas (Annonaceae) was collected in French Guiana, in the vicinity of Saint Georges de l'Oyapock (51°48'W 3°53'N) in November 2002. The herbarium voucher (GB2983) was deposited in the French Guiana Herbarium (CAY) and determined by specialists. The trunk bark was dried in an air drier in the shade. Traditionally, a decoction of the bark of this species is used among the Palikour Amerindians to treat fever, malaria and diarrhoea.

### Extraction and isolation of compounds

Ground bark from *P. cuspidata* (1.2 kg) was first defatted with petroleum ether (5 L  $\times$  2) at room temperature. After removal of petroleum ether under reduced pressure, the dried powder obtained was impregnated with an ammonia solution and percolated with  $\text{Et}_2\text{O}$  (15 L). After removal of  $\text{Et}_2\text{O}$ , 35 g of dry extract was obtained. This extract was subjected to column chromatography on silica gel (70–200  $\mu\text{m}$ , 10  $\times$  45 cm), treated with sodium acetate (20:1, SiOH-NaOAc), and eluted with hexane- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH [from hexane- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1 to  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 1:1 (20 L)] to give five fractions, A to E. After biological evaluation, the active fraction C (6 g) was chromatographed on a silica gel medium pressure column (6–35  $\mu\text{m}$ , 4.5  $\times$  20 cm) with a gradient of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100%) to  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 1:1 (15 L). Three fractions  $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$  were obtained. Fraction  $\text{C}_1$  (1.57 g) was chromatographed under medium pressure as previously described, and a final purification was performed by crystallization in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  1:4:0.5 (50 mg in 1 mL). Compound **3** was obtained as white needles (45 mg). Compounds **1** (16 mg), **2** (12 mg) and **4** (13 mg) were obtained from fraction A by three successive medium pressure chromatographies on silica gel treated with sodium acetate (6–35  $\mu\text{m}$ , 1.5  $\times$  20 cm) and final isocratic preparative RP18-HPLC (Varian Chromatograph) was done using  $\text{CH}_3\text{CN}$ -NaOAc (pH = 9) 25:75 for **1** ( $t_{\text{R}} = 30 \text{ min}$ ), 58:42 for **2** ( $t_{\text{R}} = 32 \text{ min}$ ) and 30:70 for **4** ( $t_{\text{R}} = 40 \text{ min}$ ) at 10 mL/min.

### Assays on *Plasmodium falciparum* in vitro

The FcB1-Columbia and FcM29-Cameroon strains of *P. falciparum*, both being chloroquine-resistant [ $\text{IC}_{50}$  for chloroquine (Sigma; Saint Quentin Fallavier, France): 186 nM and 540 nM, respectively] were cultured continuously according to Trager and Jensen et al.

[4], with modifications described by Van Huyssen and Rieckmann et al. [5]. The  $IC_{50}$  values for chloroquine were checked every 2 months, and we observed no significant variations. The parasites were maintained *in vitro* in human red blood cells ( $O\pm$ ; EFS; Toulouse, France), diluted to 1% hematocrit in RPMI 1640 medium (Cambrex; Emerainville, France) supplemented with 25 mM Hepes and 30 mM  $NaHCO_3$  (Sigma) and complemented with 5% human AB+ serum (EFS).

Parasite cultures were synchronized by D-sorbitol lysis (5% of D-sorbitol in sterile water; D-sorbitol; Merck) as reported by Lambros and Vanderberg [6]. The antimalarial activities of plant extracts and purified compounds were evaluated by the radioactive micromethod described by Desjardins et al. [7] with the modifications reported by Benoit et al. [8]. Extract testing was performed in triplicate in 96-well culture plates (TPP) with cultures mostly at ring stages (synchronisation interval, 16 h) at 0.5–1% parasitemia (hematocrit, 1%). Parasite culture was incubated with each extract for 48 h. Parasite growth was estimated by [ $^3H$ ]-hypoxanthine (Perkin-Elmer; Courtaboeuf, France) incorporation, [ $^3H$ ]-hypoxanthine being added to the plates 24 h before freezing. After the 48 h incubation, plates were frozen-defrosted and each well was harvested on a glass fiber filter. Incorporated [ $^3H$ ]-hypoxanthine was then determined with a beta-counter (1450-Microbeta Trilux; Wallac-Perkin Elmer).  $IC_{50}$  values were determined by linear least square regression analysis.

The control parasite cultures free from any extracts were referred to as 100% growth.  $IC_{50}$  values were determined graphically in concentration versus percent inhibition curves. Chloroquine diphosphate (Sigma) was used as positive control.

#### Cytotoxicity evaluation

Cytotoxicity of the pure compounds was estimated on human breast cancer cells (MCF7). The cells were cultured in the same conditions as those used for *P. falciparum*, except for the 5% human serum, which was replaced by 5% fetal calf serum (Cambrex). For the determination of pure compound cytotoxicity, cells were distributed in 96-well plates at  $2 \times 10^4$  cells/well in 100  $\mu$ L, then 100  $\mu$ L of culture medium containing extracts at various concentrations were added. Cell growth was estimated by [ $^3H$ ]-hypoxanthine incorporation after 24 and 72 h incubation exactly as for the *P. falciparum* assay. The [ $^3H$ ]-hypoxanthine incorporation in the presence of extracts or pure compounds was compared with that of control cultures without extract (positive control being doxorubicin (Sigma)) [9].

#### 1-Aza-7,8,9,10-tetramethoxy-4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroanthracene (1)

Yellow amorphous powder;  $R_f$ : 0.38, silica gel 60  $F_{254}$   $CHCl_3/MeOH/Et_2NH$  (95:4:1);  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+3^\circ$  ( $c$  1.7,  $CHCl_3$ ); IR (KBr):  $\nu_{max}$  = 1657, 3400  $cm^{-1}$ ; UV ( $CHCl_3$ ):  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 254 (5.13), 287 (5.18), 296 (5.16), 351 (4.25), 362 (4.30) nm;  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz):  $\delta$  = 2.78 (3H, s, H-11), 3.92 (3H, s, H-14), 3.96 (3H, s, H-12), 4.06 (3H, s, H-13), 6.43 (1H, s, H-3), 7.31 (1H, d,  $J$  = 9.5 Hz, H-6), 8.01 (1H, d,  $J$  = 9.5 Hz, H-5), 9.17 (1H, s, H-1);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 125 MHz):  $\delta$  = 23.2 (C-11), 56.6 (C-13), 62.1 (C-14), 62.7 (C-15), 64.1 (C-12), 112.4 (C-4a), 113.4 (C-6), 120.7 (C-5), 121.3 (C-10a), 122.5 (C-3), 124.3 (C-8a), 129.7 (C-9a), 134.5 (C-9), 141.2 (C-8), 148.5 (C-4), 151.3 (C-7), 151.7 (C-10), 161.9 (C-2); HR-

ESI-MS (positive ion mode):  $m/z$  = 330.1214 [ $M + H$ ] $^+$  (calcd. for  $C_{18}H_{20}NO_5$ : 330.1341).

#### 1S,1R-Rodiasine (2)

White needles, ( $CHCl_3/MeOH$ , 1:3, v/v); m.p. 203–208  $^\circ C$ ;  $R_f$ : 0.75, silica gel 60  $F_{254}$   $CHCl_3/MeOH/Et_2NH$  (95:4:1);  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+74^\circ$  ( $c$  1.7,  $CHCl_3$ ); UV ( $MeOH$ ):  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 204 (4.5), 212 (4.2), 233 (4.1), 284 (4.1), 284 (4.0) nm; IR (KBr):  $\nu_{max}$  = 1624, 1648, 1686  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz):  $\delta$  = 2.35 (3H, s, NMe-2), 2.49 (2H, m, H-4), 2.65 (3H, s, NMe-2), 2.86–2.96 (2H, dd,  $J$  = 14.0, 8.0 Hz, H- $\alpha$ ), 2.97 (1H, m, H- $\alpha'$ s), 2.56–3.05 (2H, m, H-4), 2.56–3.05 (2H, m, H-4'), 2.62–3.31 (2H, m, H-3'), 3.09 (1H, m, H- $\alpha'$ r), 2.93–3.47 (2H, m, H-3), 3.32 (3H, s, OMe-6'), 3.50 (3H, s, OMe-7), 3.69 (1H, bdd,  $J$  = 3.9, 4.1 Hz, H-1'), 3.80 (3H, s, OMe-12), 3.83 (3H, s, OMe-6), 4.03 (1H, bd,  $J$  = 7.5,  $<1$  Hz, H-1), 6.40 (2H, bs, H-5 and H-5'), 6.85 (1H, d,  $J$  = 8.1 Hz, H-13'), 6.87 (1H, d,  $J$  = 8.1 Hz, H-13), 7.07 (1H, bs, H-8'), 7.27 (1H, dd,  $J$  = 8.1, 2.2 Hz, H-14), 7.28 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-10);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 125 MHz):  $\delta$  = 22.7 (C-4), 27.6 (C-4'), 37.6 (C- $\alpha'$ ), 42.2 (C-15), 43.5 (C-15'), 41.5 (C- $\alpha$ ), 44.6 (C-3), 49.3 (C-3'), 55.6 (OMe-6'), 56.0 (OMe-6), 56.4 (OMe-12), 60.4 (OMe-7), 62.8 (C-1), 65.1 (C-1'), 106.6 (C-5), 110.7 (C-13), 113.4 (C-5'), 117.0 (C-5), 117.9 (C-11'), 118.8 (C-8'), 124.9 (C-8a), 125.5 (C-4'a), 127.8 (C-8'a), 128.2 (C-4a), 129.5 (C-14), 130.7 (C-14', C-10'), 131.2 (C-9'), 135.4 (C-10), 137.3 (C-9, C-11), 139.1 (C-7), 143.7 (C-7'), 147.7 (C-6'), 149.3 (C-8), 151.5 (C-6), 151.8 (C-12'), 153.16 (C-12); HR-ESI-MS (positive ion mode):  $m/z$  = 623.3129 [ $M + H$ ] $^+$  (calcd. for  $C_{38}H_{43}N_2O_6$ : 623.3121).

The physicochemical data of compounds **3** and **4** are presented in the Supporting Information.

#### Results and Discussion

Compound **1** (Fig. 1) was found to possess a molecular formula of  $C_{18}H_{19}NO_5$  as derived from its ESI-Q-TOF-HR-MS at  $m/z$  = 330.1214 [ $M + H$ ] $^+$  (calcd. 330.1341).

The  $CDCl_3$  500 MHz  $^1H$ -NMR spectrum (Table 1S in Supporting Information) of **1** showed the presence of a methyl group ( $\delta$  = 2.78, s) linked to an  $sp^2$  carbon, an olefinic proton as a broad singlet ( $\delta$  = 6.43) due to long-range coupling with the methyl group, four methoxy singlets ( $\delta$  = 3.92, 3.95, 3.96 and 4.04) and two vicinal aromatic protons ( $\delta$  = 7.31 and  $\delta$  = 8.01,  $J$  = 9.5 Hz). The  $^{13}C$ -NMR spectrum (Table 1S in Supporting Information) confirmed the previous deductions by the presence of 18 carbons including one methyl and four methoxy groups ( $\delta$  = 23.2 and 56.6 to 64.1, respectively), ten quaternary carbons including a conjugated carbonyl ( $\delta$  = 161.9 ppm) and three olefinic carbons ( $\delta$  = 113.4, 120.7 and 122.5). Except for the methyl and methoxy groups, all  $^1H$  and  $^{13}C$ -NMR signals (14 carbons) resonated in the aromatic region, thus suggesting an anthracene skeleton for **1**. This was confirmed by UV bands (254, 287, 296, 351 and 362 nm) characteristic of aromatic conjugated rings. The conjugated carbonyl ( $\delta$  = 161.9) observed in the  $^{13}C$ -NMR spectrum was identified as a lactam group by the interpretation of the IR and  $^1H$ -NMR data that showed a low frequency carbonyl band at 1655  $cm^{-1}$  and a broad singlet at 9.17 ppm respectively, and corresponding to a non-exchangeable proton linked to a hetero-

atom. The positions of the four methoxy groups were determined unambiguously from HMBC and NOESY NMR experiments (see Table 1S in Supporting Information and Fig. 2). Total  $^{13}\text{C}$ -NMR assignments were not so clear and left some ambiguities because of long-range couplings (up to four bonds as illustrated in Table 1S in Supporting Information for H-5) observed in the HMBC spectrum due to the high level of unsaturation and the presence of numerous quaternary carbons in the structure of **1**. So, an ADEQUATE NMR spectrum (see Supporting Information) was recorded. The correlations observed in a 2D- $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ADEQUATE NMR spectrum revealed long-range coupling (two bonds) from a proton to its vicinal carbons. This spectrum was very useful to unambiguously assign all NMR data. Key correlations for NOESY and ADEQUATE experiments are illustrated in Fig. 2. Thus, the structure of this new azaanthracene alkaloid was elucidated as 1-aza-7,8,9,10-tetramethoxy-4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroanthracene. To our knowledge, compound **1** is the fourth representative of this kind of azaanthracene alkaloid known, to date, only in Annonaceae thus broadening this as yet restricted group of alkaloids. Indeed, 9,10-dimethoxyazaanthracene was described to be isolated from *Polyalthia suberosa* [10], [11] and a mixture of two trimethoxy derivatives isolated from *Annona ambotay* [12] and *Annona dioica* [13]. We confirm here the chemotaxonomic interest of this type of compound in the chemosystematics of Annonaceae. Moreover, it is worth mentioning that Tadic et al., in 1986, proposed a biosynthetic pathway, which leads to 1-azaanthraquinones. They suggested that these skeletons are oxo-aporphine-derived (see [14] for details) requiring the reduction of the quinone and the *O*-methylation of the corresponding hydroquinone giving rise to 1-azaanthracene alkaloids [14].

Compound **2** (Fig. 1) was found to possess a molecular formula of  $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_6$  as derived from its ESI-Q-TOF-HR-MS at  $m/z = 623.3129$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  (calcd. 623.3121). The  $\text{CDCl}_3$  500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (Table 2S in Supporting Information) recorded at room temperature demonstrates the presence of a bis-benzylisoquinoline structure as described before by Jossang et al. [15].  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR resonances were assigned by analysis of 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, [16], [17] and 2D heteronuclear HMQC [18] and HMBC [19] spectra. This compound is described by two spin systems of three aromatic protons (= 6.85–7.65), two spin systems of three aliphatic protons (= 2.51–3.01), two spin systems of four aliphatic protons (= 2.3–3.5), two singlets of *N*-methyl groups (= 2.35–2.65) and four singlets of *O*-methyl groups (= 3.32–3.87) and finally three isolated aromatic protons (= 6.40–7.06). The HSQC spectrum is quite helpful to distinguish between vicinal and geminal proton signals in the  $\text{CH}_2\text{CH}_2$

parts of the tetrahydroisoquinoline ring. Analysis of all spectroscopic data and comparison with values published for bis-benzylisoquinoline alkaloids led us to the identification of compound **2** as rodiasine. The *J*-based configuration analyses could be successfully applied to our molecule to determine the absolute stereochemistry at C-1 and C-1'. The dihedral angles  $\text{CH}_1\text{-CH}_s$  or  $\text{CH}_1\text{-CH}_r$  and  $\text{CH}_1'\text{-CH}'_s$  or  $\text{CH}_1'\text{-CH}'_r$  were estimated by a Karplus-type relationship [20], [21] from the vicinal proton coupling constant determined on the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  phase-sensitive COSY [22], [23] spectra: 8 Hz for  $^3J_{\text{HH}}$  corresponds to a vicinal HH dihedral angle of 25–40° or 140–155°; 10 Hz to 20–35° or 145–155°; <1 Hz to 65–115°. From these data and according to previous products described by Janseng et al., and the optical rotation ( $[\alpha]_D^{25} + 74^\circ$ ), we were able to characterize the 1*S*,1'*R* configured 16-membered ring of biphenylic bis-benzylisoquinoline alkaloids that generate two conformers at 25 °C in  $\text{CDCl}_3$  (one of which is highly populated, more than 90%). In view of establishing structure-activity relationships, knowledge of the 3D structure and conformational characteristics are of great interest. It is planned to study the exchange system of 1*S*,1'*R*-rodiasine by dynamic NMR spectroscopy.

In addition to compounds **1** and **2**, the alkaloids *O*-methylpunjabine (**3**) [24] and *O*-methylmoschatoline (**4**) were identified by comparison of spectroscopic data with values reported in the literature [25], [26]. These compounds are here described for the first time from *Pseudoxandra cuspidata* bark.

Because *P. cuspidata* is a traditional antimalarial plant, and because the antiplasmodial activity of its crude extracts was confirmed *in vitro* [3], the antiplasmodial activity and cytotoxicity of the compounds purified from the plant were evaluated *in vitro* (Table 1). Among the four compounds described, the most active (mean  $\text{IC}_{50}$  on FcB1 strain 0.71  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i.e., 1.14  $\mu\text{M}$ ) and least toxic was rodiasine (**2**). The other compounds were less active or were inactive against *P. falciparum*. When compared to other bis-benzylisoquinolines, the toxicity of **2** was rather low [9], [27] while antiplasmodial activity was high. However, 1*S*,1'*R*-rodiasine as a major component of the extract of *Pseudoxandra cuspidata*, could be responsible for the known antimalarial activity of the plant stressing the antimalarial interest of this family [28].

Table 1 Antiplasmodial activity and cytotoxicity of the purified compounds from *P. cuspidata*

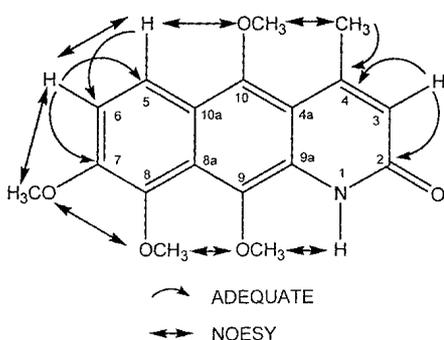
Compound	Antiplasmodial activity		Cytotoxicity	CAR <sup>a</sup>
	FcB1 strain (n = 3) <sup>b</sup>	FcM29 strain (n = 2)	MCF7 (n = 3)	
(1)	42.92 ± 28.19 <sup>c</sup>	40.90 ± 2.12	43.93 ± 2.14	1.02
(2)	1.14 ± 0.8	1.36 ± 0.14	28.08 ± 7.94	24.64 $\alpha$
(3)	13.67 ± 9.89	12.5 ± 2.12	5.48 ± 1.57	0.40
(4)	> 100	> 100	46.69 ± 2.9	0.46
CQ	0.19 <sup>d</sup>	0.54 <sup>d</sup>	> 100	> 500
Doxorubicin	ND	ND	4.5 <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Cytotoxicity/antiplasmodial (FcB1) ratio.

<sup>b</sup> n = number of independent experiments.

<sup>c</sup> Mean values of three independent experiments in  $\mu\text{M}$  ( $\pm$  SD).

<sup>d</sup> Value checked every two months.



## Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. V erena Poinsoot from Laboratoire des IMRCP (UMR 5623 UPS/CNRS), Toulouse, for high resolution mass spectrometric analyzes, Dr. F. Beno t-Vical from Service de Parasitologie-Mycologie, CHU Rangueil, Toulouse for radioactivity measurements; Eliane P elissou from UMR 152, for technical assistance in biological evaluations, Antonio Narciso, for sharing his knowledge and help in the plant collection and Pr. Paul Maas for scientific determination of the plant. Finally, many thanks to Dr. Peter Winterton for his kind English revision.

## References

- 1 World malaria report. Available at <http://rbm.who.int/wmr2005>. Accessed in 2005.
- 2 Phillipson JD, Wright CW. Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? *J Ethnopharmacol* 1991; 32: 155–65
- 3 Bertani S, Bourdy G, Landau I, Robinson JC, Esterre P, Deharo E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *J Ethnopharmacol* 2005; 98: 45–54
- 4 Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193: 673–5
- 5 Van Huysen W, Rieckmann KH. Disposable environmental chamber for assessing the drug susceptibility of malaria parasites. *Trop Med Parasitol* 1993; 44: 329–30
- 6 Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979; 65: 418–20
- 7 Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16: 710–8
- 8 Benoit F, Valentin A, Pelissier Y, Diafouka F, Marion C, Kone-Bamba D et al. *In vitro* antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 67–71
- 9 Valentin A, Benoit-Vical F, Moulis C, Stanislas E, Mallie M, Fouraste I et al. *In vitro* antimalarial activity of penduline, a bisbenzylisoquinoline from *Isopyrum thalictroides*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2305–7
- 10 Thinapong P, Rangsiman O, Tuchinda P, Munyoo B, Pohmakotr M, Reutrakul V. 9,10-Dimethoxy-4-methyl-1,2-dihydro-1-azaanthracen-2-one (kalasinamide), a new azaanthracene alkaloid. *Acta Crystallogr C* 2000; 56: E309–10
- 11 Tuchinda P, Pohmakotr M, Munyoo B, Reutrakul V, Santisuk T. An azaanthracene alkaloid from *Polyalthia suberosa*. *Phytochemistry* 2000; 53: 1079–82
- 12 De Oliveira BA, De Oliveira G, Carazza G, Guilherme GS, Jose M. Geovanine, a new azaanthracene alkaloid from *Annona ambotay* Aubl. *Phytochemistry* 1987; 26: 2650–1
- 13 dos Santos PRD, Morais AA, Braz R. Alkaloids from *Annona dioica*. *J Braz Chem Soc* 2003; 14: 396–400
- 14 Tadic D, Cassels BK, Leboeuf M, Cave A. Kinabaline and the aporphinoid biogenesis-of azaanthracene and azafluorene alkaloids. *Phytochemistry* 1987; 26: 537–41
- 15 Jossang A, Cave A, Saez J, Bartoli MH, Jossang P. Two highly populated conformations at room temperature of monterine and granjine, anti-tumor bis-benzylisoquinoline alkaloids: origin and tridimensional structures. *J Org Chem* 1996; 61: 3023–30
- 16 Macura S, Kumar NG, Brown LR. Combined use of COSY and double quantum two-dimensional NMR spectroscopy for elucidation of spin systems in polymyxin B. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117: 486–92
- 17 Kumar A, Ernst RR, Wuthrich K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 1–6
- 18 Bax A, Lerner L. Two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* 1986; 232: 960–7
- 19 Bax A, Summers MF. Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J Am Chem Soc* 1986; 108: 2093–4
- 20 Haasnoot CAG, de Leeuw FAAM, Altona C. The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities – I: An empirical generalization of the Karplus equation. *Tetrahedron* 1980; 36: 2783–92
- 21 Jackman LM, Sternhell S. Applications of NMR spectroscopy in organic chemistry; 2nd Edition New York: Pergamon Press, 1969
- 22 Marion D, Wuthrich K. Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113: 967–74
- 23 Neuhaus D, Wagner G, Vasak M, Kagi JH, Wuthrich K. Systematic application of high-resolution, phase-sensitive two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR techniques for the identification of the amino-acid-proton spin systems in proteins. Rabbit metallothionein-2. *Eur J Biochem* 1985; 151: 257–73
- 24 Kunitomo J, Murakami Y, Oshikata M, Akasu M, Kodama K, Takeda N et al. Kunitomo, the alkaloids of *Stephania sasakii* Hayata. Part XV. O-Methyldeoxopunjabine, a secobisbenzylisoquinoline alkaloid bearing an aryl methyl group, and three other secobisbenzylisoquinoline alkaloids, O-methylpunjabine, secocepharanthine, and dihydrosecocepharanthine, from *Stephania sasakii*. *Chem Pharm Bull* 1985; 33: 135–43
- 25 Marsaioli AJ, Magalhaes AF, Ruveda EA, Reis FAM. <sup>13</sup>C NMR analysis of some oxoaporphine alkaloids. *Phytochemistry* 1980; 19: 995–7
- 26 Kanyinda B, Vanhaelen-Fastre R, Vanhaelen M. Two new secobisbenzylisoquinoline alkaloids from the leaves of *Anisocycla jollyana*. *J Nat Prod* 1996; 59: 498–500
- 27 Angerhofer CK, Guinaudeau H, Wongpanich V, Pezzuto JM, Cordell GA. Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bis-benzylisoquinoline alkaloids. *J Nat Prod* 1999; 62: 59–66
- 28 Steele JC, Simmonds MS, Veitch NC, Warhurst DC. Evaluation of the anti-plasmodial activity of bis-benzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Med* 1999; 65: 413–6

## Amazonian plants from Peru used by Quechua and Mestizo to treat malaria with evaluation of their activity

V. Roumy<sup>a,\*</sup>, G. Garcia-Pizango<sup>b</sup>, A.-L. Gutierrez-Choquevilca<sup>c,d</sup>, L. Ruiz<sup>b</sup>,  
V. Jullian<sup>a</sup>, P. Winterton<sup>e</sup>, N. Fabre<sup>a</sup>, C. Moulis<sup>a</sup>, A. Valentin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox, UMR 152 IRD-Université, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse, France

<sup>b</sup> Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Amazonia (LIPNA), Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), Iquitos, Peru

<sup>c</sup> Laboratoire EREA (Equipe de Recherche en Ethnologie Amérindienne) CNRS-Villejuif, Université Nanterre-Paris-X, France

<sup>d</sup> IFEA (Institut Français d'Etudes Andines), Lima, Peru

<sup>e</sup> Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France

Received 22 December 2006; received in revised form 10 April 2007; accepted 13 April 2007  
Available online 24 April 2007

### Abstract

Indigenous Quechua and Mestizo populations from distinct areas in Loreto, Peru, were interviewed about traditional medication for the treatment of malaria. An ethnographic survey concerning the native theory of illness aetiology in the specific case of malaria permitted the elaboration of an efficient ethnopharmacological enquiry. The survey took place on three main zones corresponding to villages on the Napo and the Pastaza rivers (for the Quechua), and in the surroundings of Iquitos (for the Mestizos) and led to the collection of 14 plants. Serial extractions in hexane, dichloromethane, and methanol were performed on the different parts of the plants collected. The extracts were then tested for antiplasmodial activity *in vitro*. Seven plants displayed antiplasmodial activity ( $IC_{50}$  from 2 to 25  $\mu\text{g/mL}$ ) and usually low cytotoxicity, indicating their antiplasmodial specificity. The results give scientific validation to the traditional medical knowledge of Quechua and Mestizo populations from Loreto and confirm a source of potentially active plants.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Malaria; Loreto; *In vitro* screening; Quechua; Ethnomedicine; Peru

### 1. Introduction

Malaria remains one of the most important infectious diseases in the world affecting hundreds of millions of people and causing up to 3 million deaths annually (mostly children). Difficulties in getting access to treatment, for both economic and geographical reasons, result in increased mortality. Besides this fact, in many cases, drug effectiveness is lost due to parasite resistance. In this context, safe, effective and accessible new treatments have become a matter of priority. Plant remedies seem to be the

most convenient solution because of their accessibility and diversity in tropical regions. This study focused on the province of Loreto, which is classified by the WHO as a grade III zone for its high frequency of chloroquine resistant malaria. An ethnopharmacological study was performed in three locations regarding three groups of population: Quechua of the Pastaza, Quechua of the Napo, (fieldwork period between 2003 and 2004), and the Mestizo population living around Iquitos (fieldwork achieved during 2005). These specific groups were chosen firstly, according to their ability to use medicinal plants and to transmit the knowledge. The Pastaza and Napo populations belong to the same cultural group (Quechua) and share a very similar set of medicinal knowledge, although they live in separate territories and ecosystems (see map). The Pastaza populations are also geographically isolated from medical infrastructures which reinforces the necessity for a better transmission of medicinal

\* Corresponding author at: Laboratoire Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox, UMR 152 IRD-Université Toulouse 3, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 31062 Toulouse Cedex 9, France. Tel.: +33 5 62 25 68 42; fax: +33 5 61 55 43 30.

E-mail address: [roumyvincent@yahoo.fr](mailto:roumyvincent@yahoo.fr) (V. Roumy).

knowledge. Secondly, the comparison with Mestizo medicinal knowledge offers valuable insights into the persistence of traditional knowledge in a context where access to Occidental remedies is easier, given the proximity with urban medical centers. The core of ethnographic data about the indigenous conception of illnesses and therapy gives an anthropological background to the analysis of the impact of malaria among these Amazonian groups. We underline the necessity of taking into account the context-dependence of native aetiological theories.

## 2. Material and methods

### 2.1. Ethnographic study

#### 2.1.1. Ethnographic context

The study of lowland Quechua (Kichwa) ethnomedicine in Peru took place within a complex and interwoven ecological, cultural and historico-political context. Although the Quechua people are a minority in Peru (3000 people approximately for the Pastaza river and an average of 8000 people living in the Peruvian Napo region/27.3 million inhabitants in Peru), they occupy a large part of the Amazonian lowlands. Two groups of Quechua were studied:

- The *Kichwa* (whose autodenomination is “*Napu runa*” which means “people of the Napo”) from the high Napo river. Their villages are located around a Dominical mission called Angoteros at the border with Ecuador;
- The *Quechua* (also autodenominated “*Inga*”) are located near the high Pastaza river, an area very distant from Iquitos, the province’s capital. This ethnological group is a composite of various indigenous populations, among which are the Achuar from the Jivaroan linguistic family, and the Andoan, a nearly extinct group belonging to the Zaparoan linguistic family.

The traditional economy relies on slash-and-burn horticulture, hunting fishing and gathering wild foods. This process requires and contributes to the maintenance of large forest areas, both primary and secondary, in various stages of regenera-

tion. Medicinal plants are normally cultivated and collected in primary forest. Nevertheless, Balee (Balee, 1989) and Black (Black, 1978) showed, in a study involving North American Indians, that plant species distribution in Amazonian rainforest (in the so-called primary forest) was mainly influenced by the entropic impact of human settlements at various stages of history. Indeed medicinal plants are both transplanted and protected by indigenous people (Kohn, 1992). Lowland Quechua settlements are organized according to the pattern of a “horizontal archipelago”, which underlines the mobility of people and the dynamics of migrations and exchanges (Uzendosky, 2004). Such human mobility explains that similar medicinal plants can be found in primary and secondary forests and used both in Napo and Pastaza regions. The plants may have been transplanted for human necessity from one habitat to another in a historical process, according to the group’s logic of migration. The phenomenon of migration also accounts for a shared knowledge of plants among Mestizos living in the surroundings of Iquitos and lowland Quechua populations (Fig. 1).

### 2.2. Indigenous theory of illness and therapy

#### 2.2.1. Indigenous theory of illness aetiology

The Quechua representation of various types of physical dysfunctions will be described here from an ethnographic approach for a better understanding of the native conception of malaria. It should be kept in mind that the concept of illness is obviously the result of an interpretation, and as such, it entails cosmological representations of the world and specific beliefs about the nature of the human being. The elementary assumption shared by many animist Amazonian cultures is the attribution of a common subjectivity or a “soul” to every being, including some plant and animal entities. According to this idea, elementary categories structuring social life are used to organize, in conceptual terms, the relations between human beings and natural species (Descola, 2005). Sickness in many ways reveals a disruption affecting the individual’s soul and its relation with otherness, humans or non-humans. To give an example, symptoms of illness affecting young children are conceived by the Quechua as

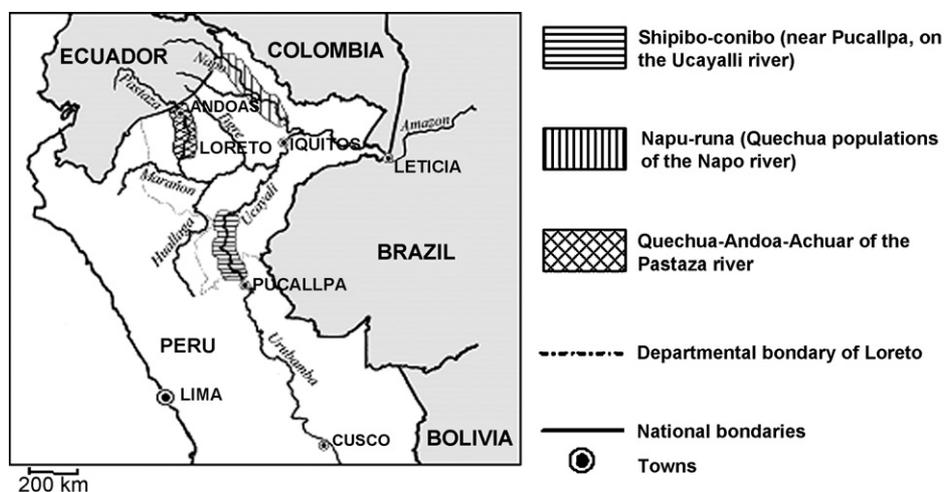


Fig. 1.

the capture of the soul by animals or spirits wishing to make their victim into kin, or to take revenge on their parents. Physical changes affecting the body are the visible indices of this process. According to our own data and those collected by Iglesias (Iglesias-Palacios, 1987), Quechua people from the Napo and Pastaza regions distinguish three types of illness categories:

- “*Unkuy*”, considered to be due to natural causes like the excess of water (dampness), wind, heat or cold. It is also a generic term referring to physical disorder in general.
- “*Pahu*”, due to supernatural origins or elements such as the encounter with mythical entities or spirits (“*supay*”) whose promiscuity is thought to be dangerous, if a number of taboos and prescriptions are not respected. It provokes visible symptoms of illness or weakness.
- “*Wiruti*” (name of blowgun darts normally used in hunting, but also used to refer to an invisible projectile used by the shaman “*yachak*” to kill his enemy) or “*shitana*” (means “to blow”) related to the ritual and shamanistic manipulation of power in order to harm. This category of illness can be classified as warfare sorcery; it is the physical consequence of underlying conflicts between distant kin from other villages or enemies from different ethnic groups.

These categories are not exclusive, a disease at first classified in category 1 “*unkuy*”, for example can soon be attributed to category 3 “*shitana*”, in specific circumstances, according to the variability of aetiological interpretation. It is interesting to note that from the first category to the third, emphasis is put on physicality and natural causes, or on the role of human or supernatural agency.

### 2.2.2. Indigenous theory of malaria

Malaria has specific indigenous terminologies used for its symptom description. Names of the diseases are related to the seriousness of the cases. For example “*chukchu unkuy*” (“shaking illness” in quechua) is said to occur when the disease does not kill the patient. It can also be qualified, according to the presence of fever, “*kalentura*” derived from the Spanish word “*calendura*”. In this latter case it is supposed to be caused by the excess of “cold” elements. The principal symptoms cited by people questioned during enquiry were, in order of importance: (a) fever (in quechua, hot sensation: “*rupa*”); (b) shivering (in quechua, shaking body, “*chukchu aycha*”); (c) hurting heart or liver (“*shunku nanay*”), we point out that the heart “*shunku*” is considered by Quechua people as the main principle of animation and the locus of the soul; (d) strong headache and dizziness (“*uma muyurin*”); (e) weakness of vision (“*yana rikurin*”, it looks dark).

In relation to the general ethno-classification of illness in regard to its presumed aetiology (see Section 2.2.1), malaria is classified in category (a) (“*chukchu unku*”) in 80% of the cases when it occurs in daily life without causing death. The minimization of the role of bad intentions determines the choice of using medicinal plants for curing, in the specific case of malaria. In this case, Quechua people think that malaria is caused by an excess of cold affecting the individual’s breath “*samay*” (term also referring to a vital principle). This interpretation is inferred by the

symptom of a suffering heart or liver (*shunku*) and the assumption that the individual’s soul or “*samay*” lies in this place. The effect of medicinal plants is to make the patient “breath” again “*samachina*”.

Malaria also appears, when it causes death or agony, in category (3), as the consequence of malevolent human entities manipulating their power “*wiruti*”. A correlation exists between sharpness of the symptoms potentially leading to death, and the attribution of a predatory intention (an external cause) to the phenomenon. This native classification of malaria as a transformation caused by a “*wiruti*” inside the body has two consequences. At first the intervention of the shaman corresponds to an attempt to find a ritual interpretation and resolution for the trouble. Secondly, a political response can be chosen. Indeed an outburst of malaria in a village often leads to warfare when the victim’s family wants to take a revenge on the presumed author of the crime. We noted, during fieldwork a coincidence between epidemics and the rise of socio-political tensions, sometimes ending in provisional dispersion of nucleated settlements or migrations to escape violence (community of Sabalo yaku, Pastaza, February 2005).

To sum up, the above study shows that a single disease, malaria, leads to the formulation of different aetiologies in native discourse and practice. The concept of illness is not considered as exclusively restricted to the relationship between individuals and their own bodies. It involves a network of social relations including non-human entities as well as different ethnic groups. The concept of body itself is the product of a social construction and transformation. Hence, every singular response adopted by indigenous people for facing malaria, such as shamanism, warfare or the use of medicinal plants, reveals the complexity and dynamics of a specific socio-political context. Because death or disease is never considered among these Amazonian groups as a mere biological fact (Taylor, 1993), medicinal knowledge is, in a logical way, always closely linked to politics.

### 2.2.3. Methodology of survey

The ethnopharmacological study and inquiry about the indigenous conception of the human body, illness and therapy were performed in autochthonous language, a variety of lowland Quechua dialect (classified by linguists as Quechua II-B). Plants classified by indigenous people as curing «malaria» were selected for our study when they fitted three of the five main symptoms described above [(a) fever, (b) shivering and (c) hurting heart or liver] or more. In other cases malaria was known and recognised under the same term “malaria” (in Spanish) in the area where populations were informed by medical brigades of the state. Ethnographic fieldwork and ethnopharmacological survey were partially undertaken during a long period (15 months overall between October 2003 and February 2005) with an interdisciplinary staff, in two main areas: the high Pastaza river and one of its affluents, the Capawari river, and the high Napo river, mainly with Quechua-Andoa-Achuar and Napu Runa groups (see Fig. 1). These areas were chosen for their distance from the Mestizo population of the province: the people there have been sufficiently in contact with the outside world to contract malaria (and other epidemic diseases), but at the same

time, they remain, especially for the case of the Pastaza population (in the villages most distant from Andoas) so isolated that they barely receive any help from the state sanitary infrastructures. As a consequence, most of these groups still possess and preserve the traditional knowledge about medicinal therapy, mainly as the only permanently available way of facing malaria.

Another part of the survey was undertaken in the surrounding area of Iquitos (Mestizo villages from the Nanay and the Amazon rivers), concerning a population informed about malaria by the medical brigades.

#### 2.2.4. Nature of enquiry

Although some 30% of the *Napu runa* may be Spanish-speaking, only 15% of the indigenous population of the Pastaza area are, which made it necessary to elaborate specific structured interviews in quechua. Informants were chosen according to a “participate observation” methodology commonly used in ethnographic surveys. Men, women and children were equally questioned because of their equal access to natural medicines.

A detailed set of information was obtained concerning:

- Description of plant species used with their respective habitat and main qualities according to indigenous classification (phytonymy) emphasizing organoleptic properties.
- Context of plant collection (hunting expedition or specific search, moment of the day, season, ritual related to the event, etc.) and description of the part of the plant used as a remedy (e.g. bark, leaf, root, fruit)
- Mode of preparation or “recipe” (for instance decoctions or infusions).
- Effects of the remedy on the human body and indications of the recipes.

### 2.3. Plant material

Those plants which are indicated for three of the five main symptoms cited above (Section 2.2.3) were selected. Vernacular terminologies were reported (Rutter, 1990), (Duke, 1994), (Arevalo, 1994) and plants were collected with the agreement of the villagers and the presidents of the indigenous federations. The plants collected were then identified and deposited at the herbarium of the *Universidad Nacional de Amazonia Peruana* (UNAP, Iquitos) and after identification, a second collection was made in the primary and secondary forest close to Iquitos.

### 2.4. Methodology for extraction and in vitro screening

#### 2.4.1. Plant extracts

The dried and pulverised parts of each plant (10 g) were successively extracted twice at 30 °C (3 h) with hexane, dichloromethane, and methanol to obtain three extracts. The extracts were filtered, and the solvents removed under reduced pressure. Two milligrams of each extract were weighed out exactly, then dissolved in DMSO to give a stock solution at 10 mg/mL used for the biological tests. Sixty-three extracts were tested.

#### 2.4.2. Antiplasmodial screening

Parasites were cultured according to the method described by Trager and Jensen (Trager and Jensen, 1976) with modifications described by Benoit (Benoit et al., 1995). Briefly, parasites (FcB1-Columbia strain, considered to be chloroquine-resistant with an IC<sub>50</sub> of 145 nM for chloroquine) were maintained on human red blood cells in RPMI 1640 medium (Cambrex, Emervainville, France) supplemented with 7.5% human serum and grown in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cultures were synchronized every 48 h by 5% D-sorbitol lysis (Lambros and Vanderberg, 1979) (Merck-Germany). For *in vitro* antiplasmodial activity evaluation, the stock solutions of plant extracts were diluted in culture medium (10 and 50 µg/mL) and added to parasite culture (1% parasitaemia, 2% haematocrit). Parasite *in vitro* growth was followed by [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine (Amersham-France) incorporation as described by Desjardins (Desjardins et al., 1979) with modifications (Valentin et al., 1997). Inhibition values were plotted versus extract concentrations (average of two values) and the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was graphically determined by interpolation. The [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine incorporation, in the presence of extracts, was compared with that of control cultures without extract (the positive control being chloroquine (Sigma)).

#### 2.4.3. Cytotoxicity evaluation

For the most active extracts (on *Plasmodium falciparum* culture), cytotoxicity was estimated on human breast cancer cells (MCF7). The cells were cultured in the same conditions as those used for *Plasmodium falciparum*, except that the 5% human serum was replaced by 5% foetal calf serum (Cambrex). Cells were distributed in 96-well plates at 2 × 10<sup>4</sup> cells/well in 100 µL of culture medium added to 100 µL of the same medium containing the plant extracts at various concentrations (the final concentrations in the wells were 1, 10, and 100 µg/mL). Cell growth was estimated by [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine incorporation after 24 and 72 h incubation as for the *Plasmodium falciparum* assay. The [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine incorporation, in the presence of extracts, was compared with that of control cultures without extract (positive control being doxorubicin (Sigma)).

## 3. Results

Species selected via the survey, as well as their medicinal uses, common names and their voucher specimen number from the herbarium of Iquitos are reported in Table 1.

All species reported were extracted and tested. Table 2 reports the antiplasmodial activities of the most active extracts, in comparison with their cytotoxicities. The CAR (cytotoxic/antiplasmodial ratio) was calculated and gave an estimation of the selectivity of the extracts on a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum*.

## 4. Discussion

Sixty-three extracts obtained from 14 plants were tested on *Plasmodium falciparum*, and at least 7 plants displayed a potential antiplasmodial activity (IC<sub>50</sub> < 25 µg/mL) (Willcox et

Table 1  
Alphabetic list and traditional uses of the species investigated for *in vitro* antiplasmodial tests

Ingredient of the recipe: species (family), herbarium voucher	Part tested	Ethnic origin	Common name and traditional preparation of the recipe	Traditional uses
<i>Abuta rufescens</i> Aubl. (Menispermaceae), 021792	B. <sup>a</sup> , L. <sup>b</sup>	Shipibo-conibo (Ucayali)	“ <i>Pancha muca, Abuta macho</i> ”, decoction of the stem	Component of curare, against stomach ulcers and malaria
<i>Cassia lorentensis</i> Killip & J. F. Macbr. Ex Killip. (Fabaceae), 029585:	B., L.	Quechua (Napo and Pastaza)	“ <i>Waranka</i> ”, decoction of the bark	Antipyretic
<i>Cyphomandra hartwegii</i> (Miers) Walp. (Solanaceae), 028197	B., Fr. <sup>c</sup> , L., R. <sup>d</sup>	Quechua (Pastaza)	“ <i>Asna panka</i> ”, infusion of the leaves, steaming bath with fresh leaf infusion for children	Against liver pains and antipyretic
<i>Eryngium foetidum</i> L. (Apiaceae), 033895 (Garcia et al., 1999; Pino et al., 1997)	L.	Quechua (Pastaza and Napo)	“ <i>Sacha kulanthro</i> ”, decoction of the leaves	Against diarrhoea, stomach ache and malaria
<i>Grias neuberthii</i> J. F. Macbr. (Lecythidaceae), 033652	B.	Quechua (Napo, Pastaza,)	“ <i>Pitun</i> ” (Napo), “ <i>Sacha mangua</i> ” (Pastaza). Infusion of the stem, bark decoction	Purifying emetic, against inappetence, intestinal parasites and malaria
<i>Lacistema aggregatum</i> (P. J. Bergius) Rusby (Lacistemaceae), 027242	B., L.	Quechua (Pastaza), Mestizo (Iquitos)	“ <i>Kapawari muyu</i> ” (Pastaza) “ <i>Huacapurana</i> ” “ <i>palometa huayo</i> ”, <i>trompo huayo</i> ” (Mestizo). Maceration in rum or decoction of the wood	Against rheumatism and anti-pyretic.
<i>Mikania congesta</i> DC. (Asteraceae), 025548	L.	Quechua (Napo), Mestizo (Iquitos)	“ <i>Yana anku</i> ” (Napo), “ <i>sanquillo</i> ” (Mestizo). Infusion of the aerial parts	Laxative and antipyretic (Herz and Kulanthaivel, 1985).
<i>Pagamea guianensis</i> Aubl. (Rubiaceae), 035904	L.	Mestizo (Iquitos)	Dried stem decoction	Psychoactive genus, species selected for its bitter substance: “ <i>principio amargo</i> ”
<i>Pithecellobium laetum</i> Benth. (Fabaceae), 021229	A.p. <sup>e</sup> .	Quechua (Napo, Pastaza,), Mestizo (Iquitos)	“ <i>Chunta ruku panka</i> ” (Napo), “ <i>sirimpachi</i> ” (Pastaza), “ <i>shimbillo</i> ” (Mestizo), infusion of the aerial parts	Against malaria
<i>Roucheria punctata</i> (Ducke) Ducke (Linaceae), 033640	B.	Quechua (Napo)	“ <i>Puma kaspi, Puma sachá</i> ”, bark decoction	Against diarrhoea and malaria
<i>Sabicea villosa</i> Willd. ex Roem. & Schult. (Rubiaceae), 024118	A.p.	Quechua (Napo)	“ <i>Huasca mullaca</i> ”, infusion of the leaves	Against stomach ache, dysentery, and malaria
<i>Verbena litoralis</i> Kunth (Verbenaceae), 033670	A.p.	Quechua (Napo, Pastaza)	“ <i>Pirpina</i> ”, infusion of the leaves	Antitussive, emetic, vermifuge, antipyretic
<i>Viola calophylla</i> (Spruce) Warb. (Myristicaceae), 035901	B., L.	Quechua (Napo-Pastaza)	“ <i>Yura wapa</i> ”, inner bark decoction	Against fungi, bladder and stomach ailments, and malaria
<i>Zygia latifolia</i> (L.) Fawc. & Rendle (Fabaceae), 021217	A.p.	Quechua (Pastaza)	“ <i>Yutsu</i> ”, infusion of the leaves, ingestion of the fresh bark resin	Purifying emetic, antipyretic and anti-malarial

<sup>a</sup> B.: stem bark.

<sup>b</sup> L.: leaves.

<sup>c</sup> Fr.: fruits.

<sup>d</sup> R.: roots.

<sup>e</sup> A.p.: aerial parts.

Table 2  
Antiplasmodial activities ( $IC_{50} < 25 \mu\text{g/mL}$ ) of the plant extracts

Active parts of the species	Extracts	<i>In vitro</i> activity on <i>Plasmodium falciparum</i> FcB1 (2) <sup>a</sup> $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cytotoxicity MCF7 (2) <sup>a</sup> $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	CAR <sup>b</sup> FcB1
<i>Abuta rufescens</i> Aubl. (Menispermaceae), bark and leaves	Bark $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$2.3 \pm 0.4^c$	$22.5 \pm 4.5$	9.6
	Bark MeOH	$3.8 \pm 0.3$	$44.0 \pm 3.0$	11.5
	Leaves $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$7.9 \pm 0.1$	$36.5 \pm 3.5$	4.6
	Leaves MeOH	$3.2 \pm 0.2$	>50.0	>15.0
<i>Cyphomandra hartwegii</i> (Miers) Walp. (Solanaceae), bark and leaves	Leaves	$10.0 \pm 4.0$	$33.0 \pm 0.5$	3.3
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$			
<i>Grias neuberthii</i> J. F. Macbr. (Lecythidaceae), bark	Bark MeOH	$22.0 \pm 0.0$	>50.0	>2.2
<i>Lacistema aggregatum</i> (P. J. Bergius) Rusby (Lacistemaceae), bark	Bark $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$7.4 \pm 2.5$	$41.0 \pm 1.0$	5.5
<i>Pagamea guianensis</i> Aubl. (Rubiaceae), leaves	Leaves	$18.5 \pm 1.5$	$31.0 \pm 3.0$	1.7
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$			
<i>Sabicea villosa</i> Willd. ex Roem. & Schult. (Rubiaceae), aerial parts	Aerial parts	$5.3 \pm 1.1$	>50.0	>10.0
	Hexane			
<i>Virola calophylla</i> (Spruce) Warb. (Myristicaceae), bark	Bark $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$4.3 \pm 0.4$	$35.5 \pm 0.5$	8.2
CQ <sup>d</sup>		0.14	>100.0	>500.0
Dox <sup>e</sup>		ND	0.4	ND

<sup>a</sup> Number of independent experiments.

<sup>b</sup> CAR cytotoxic/antiplasmodial (FcB1) ratio.

<sup>c</sup> Mean  $\pm$  S.D.

<sup>d</sup> CQ, chloroquine; positive control for *Plasmodium falciparum* inhibition.

<sup>e</sup> Dox, doxorubicin; positive control for MCF7 inhibition.

al., 2004). This demonstrates that the ethnopharmacological approach is a powerful tool to select plants among the countless possible candidates. In the following discussion, we present the plants with the best activities on *Plasmodium falciparum*.

*Abuta rufescens* Aubl. (Menispermaceae), bark and leaves: The leaves of this plant are used by the Shipibo-Conibo people to produce curare and the bark decoction is employed against stomach ulcers, liver pains, diabetes, and malaria (Arevalo, 1994). The good-to-moderate antiplasmodial activity of the leaves and bark extracts (dichloromethane and methanol) with an  $IC_{50}$  from 2.3 to 7.9  $\mu\text{g/mL}$ , can be explained by the presence of isoquinoline, azafluoranthene and oxoaporphine alkaloids isolated from the stem (Cava et al., 1975). Another species, *Abuta grandifolia* Mart. has been previously studied for its antiplasmodial activity due to its bisbenzylisoquinoline content (Steele et al., 1999). However, the species *Abuta rufescens* had never been tested for its antiplasmodial activity. *Cyphomandra hartwegii* (Miers) Walp. (Solanaceae), leaves and roots: The fruits are edible and the leaves are used as an antipyretic by the Quechua from Pastaza. Its common name in quechua is “*Asna panka*” which means “bad-smelling leaf”. Various parts of the plant were tested *in vitro* and the best antiplasmodial activity ( $IC_{50}$ : 10  $\mu\text{g/mL}$ ) was obtained with the dichloromethane extract of the leaves. To our knowledge, this species has never been chemically or biologically studied and was the first of its genus to be tested on *Plasmodium falciparum*. *Grias neuberthii* J. F. Macbr. (Lecythidaceae), bark: The stem infusion of this species is used by the Quechua (Pastaza) as a purifying emetic, against inappetence and malaria. Its name “*sacha mangua*” means mango from the wild forest. This

species has never been chemically studied and we show that it displays a weak antiplasmodial activity ( $IC_{50}$  of the methanol extract: 22.0  $\mu\text{g/mL}$ ).

*Lacistema aggregatum* (P. J. Bergius) Rusby (Lacistemaceae), bark: The bark is commonly used macerated in rum “*huacapurana*” against rheumatism and as an antipyretic. To date, this species had not been chemically investigated. The dichloromethane extract of the bark displayed a good antiplasmodial activity ( $IC_{50}$ : 7.4  $\mu\text{g/mL}$ ) with a low cytotoxicity ( $IC_{50}$ : 41.0  $\mu\text{g/mL}$ ).

*Pagamea guianensis* Aubl. (Rubiaceae), leaves: This species belongs to a genus traditionally used for its psychoactive activity (like *Pagamea macrophylla*) (De Smet, 1985). *Pagamea guianensis* was selected for its bitter flavour “*principio amargo*” that is usually considered to be due to the presence of anti-infectious substances (Shepard, 2004). This species had never been chemically or biologically studied and showed a weak antiplasmodial activity ( $IC_{50}$ : 18.5  $\mu\text{g/mL}$  for the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  leaf extract).

*Sabicea villosa* Willd. ex Roem. & Schult. (Rubiaceae), aerial parts: The leaf infusion of this plant is used against stomach disorders, dysentery and malaria. This plant has been studied for its anti-radical-type action (Pauly, 2000). However, the chemical composition of this species has not been described yet. The good antiplasmodial activity of the hexane extract of the aerial part ( $IC_{50}$ : 5.3  $\mu\text{g/mL}$ ) and its very low cytotoxicity ( $IC_{50}$ : >50  $\mu\text{g/mL}$ ) stressed the interest of this species for further phytochemical studies.

*Virola calophylla* (Spruce) Warb. (Myristicaceae), bark: This plant, named “*yura wapa*” (white *Kumala*), is used by the Quechua of the Napo as a bark decoction against external

infections and malaria. The genus *Virola* has usually been described as a source of hallucinogenic snuff. The antiplasmodial activity of the essential oil of another species of this genus (*Virola surinamensis*) has already been described (Lopes et al., 1999). Neolignans (Alvarez et al., 1987), dihydrochalcones (Constanza et al., 1998) and alkaloids (tryptamine and  $\beta$ -carboline derivatives) (Miles et al., 1987) have been isolated from the species *Virola calophylla*. However, no study concerning the antiplasmodial activities has been published, despite a good activity of the extract (IC<sub>50</sub> of the dichloromethane bark extract: 4.3  $\mu$ g/mL).

Among all the species tested in this study, three (*Abuta rufescens*, *Eryngium foetidum*, and *Grias neubertii*) have been recently cited for their use in traditional medicine against malaria (Kvist et al., 2006). However, the IC<sub>50</sub> antiplasmodial values of these species are reported for the first time in this study.

Chloroquine was used as positive control of the sensitivity of susceptible *Plasmodium falciparum* strains (FcB1). Comparison of the plant extract activities with those of chloroquine (which is 20 times more active) does not indicate that the bio-active compounds of the plant extracts have a low activity but that they are diluted in the whole extracts.

The dichloromethane extracts of *Cyphomandra hartwegii*, *Lacistema aggregatum*, *Virola calophylla* and the hexane extract of *Sabicea villosa* were the most potent against *Plasmodium falciparum* (IC<sub>50</sub>: from 4.3 to 10  $\mu$ g/mL). The low cytotoxicities (IC<sub>50</sub> > 35.5  $\mu$ g/mL) and the selectivity of the plant extracts showed the medicinal potential of these species.

## 5. Conclusion

The high quantity of potentially active plants (7) in comparison with the total number of plants collected (14) gave scientific support to the indigenous knowledge and showed the suitability of this type of survey to identify bio-active plants. The interesting cytotoxic/antiplasmodial (FcB1) ratio, the high antiplasmodial activity and the low level of prior scientific knowledge concerning the plants, were the three main criteria used to select the most interesting parts of the plants, namely the leaves of *Cyphomandra hartwegii* (Solanaceae), the bark of *Lacistema aggregatum* (Lacistemaceae), the aerial parts of *Sabicea villosa* (Rubiaceae), and the bark of *Virola calophylla* (Myristicaceae). Bioactivity-guided chemical fractionation of these plants is underway, to isolate and identify potentially novel antiplasmodial molecules.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the botanist Juan Ruiz from the herbarium of Iquitos, the staff of the laboratory of phytochemistry of the UNAP and Peggy Rigou for their important collaboration in this study. We are also indebted to the Quechua people from the Napo and the Pastaza rivers (“ñukanchipa wawkikuna”, our brothers) with other people (Mestizo) from the surrounding area of Iquitos, who patiently shared their knowledge regarding their traditional medicines, courageously facing the ignorance of the observer, and without whom this study

would not have been possible. We are also very grateful to Henry Godard, director of IFEA (Institut Français d'Études Andines) and our friend Elsy Huboux for their unconditional support during research in the field.

## References

- Alvarez, V.E., Cuca, S.L.E., Martinez, V.J.C., 1987. Chemistry of Colombian myristicaceae, neolignans in leaves of *Virola calophylla* (Warb.). *Revista Colombiana de Química* 14, 31–41.
- Arevalo, V.G., 1994. Las plantas medicinales y su beneficio en la salud. In: Shipibo-Conibo. AIDSESEP, Lima, pp. 225–226.
- Balee, W., 1989. The culture of Amazonian forests. *Advances in economic botany* 6.
- Benoit, F., Valentin, A., Pelissier, Y., Marion, C., Dakuyo, Z., Mallie, M., Bastide, J.M., 1995. Antimalarial activity *in vitro* of *Cochlospermum tinctorium* tubercle extracts. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89, 217–218.
- Black, M., 1978. Plant dispersal by native North Americans in the Canadian Subarctic. *The Nature and Status of Ethnobotany* 1, 255–262.
- Cava, M.P., Buck, K.T., Noguchi, I., Srinivasan, M., Rao, M.G., DaRocha, A.I., 1975. Alkaloids of *Abuta imene* and *A. rufescens*. *Tetrahedron* 31, 1667–1669.
- Constanza, R.O., Luis, E.C.S., Juan, C.M.V., 1998. Chemical and microbiological study of the ethanolic extracts of leaves and bark of *Virola calophylla* (Myristicaceae). *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 27, 25–29.
- De Smet, P.A., 1985. A multidisciplinary overview of intoxicating snuff rituals in the western hemisphere. *Journal of Ethnopharmacology* 13, 3–49.
- Descola, P., 2005. Par-delà nature et culture. Gallimard, Paris, pp. 183–203.
- 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 Chemotherapy* 16, 710–718.
- Duke, J.A.V., 1994. Amazonian ethnobotanical dictionary. Boca Raton.
- García, M.D., Saenz, M.T., Gomez, M.A., Fernandez, M.A., 1999. Topical anti-inflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phytotherapy Research* 13, 78–80.
- Herz, W., Kulanthaivel, P., 1985. Diterpenes and sesquiterpene lactones from *Mikania congesta*. *Phytochemistry* 24, 1761–1768.
- Iglesias-Palacios, G., 1987. Sacha jambi. Abya-Yala, Quito, pp.45–87.
- Kohn, E., 1992. La cultura médica de los Runas de la region Amazonica Ecuatoriana. *Hombre y Ambiente* 21, pp. 67–68.
- Kvist, L.P., Christensen, S.B., Rasmussen, H.B., Mejia, K., Gonzalez, A., 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 390–402.
- Lambros, C., Vanderberg, J.P., 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *The Journal of Parasitology* 65, 418–420.
- Lopes, N.P., Kato, M.J., Andrade, E.H., Maia, J.G., Yoshida, M., Planchart, A.R., Katzin, A.M., 1999. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (RoL.) Warb. by Waiapi Amazon Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 313–319.
- Miles, D.H., Ly, A.M., Randle, S.A., Hedin, P.A., Burks, M.L., 1987. Alkaloidal insect antifeedants from *Virola calophylla* Warb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35, 794–797.
- Pauly G., M.C., 2000. Use of plant extracts with an anti-radical-type action.
- Pino, J.A., Rosado, A., Fuentes, V., 1997. Composition of the leaf oil of *Eryngium foetidum* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research* 9, 467–468.
- Rutter, R.A., 1990. Catalogo de plantas utiles de la Amazonia Peruana. Instituto Lingüístico de Verano, Pucallpa, p. 345.
- Shepard, G.H., 2004. A sensory ecology of medicinal plant therapy in two Amazonian societies. *American Anthropologist* 106, 252–266.
- Steele, J.C.P., Simmonds, M.S.J., Veitch, N.C., Warhurst, D.C., 1999. Evaluation of the anti-plasmodial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Medica* 65, 413–416.

- Taylor, A.C., 1993. Remembering to forget, identity, mourning and memory among the Jivaro. *Man* 28, 653–678.
- Trager, W., Jensen, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673–675.
- Uzendosky, M.A., 2004. The horizontal archipelago: The Quijos/Upper Napo regional system. *Ethnohistory* 51, 317–357.
- 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 Chemotherapy* 41, 2305–2307.
- Willcox, M., Bodeker, G., Rasoanaivo, Ph., 2004. *Traditional Medicinal Plants and Malaria*. CRC Press, Boca Raton, pp. 261–262.

## **Etude phytochimique de plantes amazoniennes d'activité antiplasmodiale, dont *Tapirira guianensis* Aubl. et *Pseudoxandra cuspidata* Maas**

Le paludisme est la première cause de mortalité dans le monde. Ce problème de santé publique est en grande partie expliqué par l'émergence perpétuelle de chimiorésistances aux principaux antipaludiques. La recherche de nouveaux traitements accessibles et efficaces contre son agent pathogène, *Plasmodium falciparum*, constitue donc une urgence. Le travail exposé dans cette thèse porte sur un des axes majeur de cette quête : l'exploration phytochimique de plantes utilisées dans différentes médecines traditionnelles.

Nous avons tout d'abord sélectionné différentes drogues végétales en fonction de leurs utilisations traditionnelles anti-parasitaires au sein de multiples groupes ethniques d'Amazonie (Guyane et Pérou). Nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux groupes Quechuas du Pérou afin d'approfondir nos connaissances de la maladie et d'évaluer une vingtaine d'espèces végétales issues de leur médecine traditionnelle, dont certaines se sont avérées prometteuses.

Puis, nous avons réalisé une étude phytochimique bioguidée permettant la purification de molécules responsables de l'activité antiplasmodiale de deux plantes guyanaises, *Pseudoxandra cuspidata* Maas et *Tapirira guianensis* Aubl.

Ce travail a permis d'identifier des composés appartenant à différentes familles chimiques (alcaloïdes de type bisbenzylisoquinoléine, aza-anthracène, aporphine ; cyclo-hexénone alkylée...), dont certains encore inconnue dans le monde végétale.

Nous nous sommes particulièrement intéressé au potentiel thérapeutique de certains de ces extraits et molécules, et mis en évidence d'autres activités biologiques (anti-leishmanienne ou anti-bactérienne).

Enfin, ce travail conclut sur la validité de cette méthode de recherche et donne une ouverture sur l'étude phytochimique d'autres espèces végétales déjà sélectionnées.