



HAL
open science

Recherche de composés à activité antiplasmodiale à partir de la biodiversité malgache

Ahmed-Mehdi Beniddir

► **To cite this version:**

Ahmed-Mehdi Beniddir. Recherche de composés à activité antiplasmodiale à partir de la biodiversité malgache. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114847 . tel-00796218

HAL Id: tel-00796218

<https://theses.hal.science/tel-00796218>

Submitted on 2 Mar 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE : CHIMIE

ANNÉE 2009 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N°1184

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue publiquement le 31/10/2012

par

Ahmed Mehdi BENIDDIR

Recherche de composés à activité antiplasmodiale à partir
de la biodiversité malgache

Directrice de thèse :
Co-directeur de thèse :

Françoise GUÉRITTE Directrice de recherche INSERM (ICSN-CNRS)
Marc LITAUDON Ingénieur de recherche CNRS (ICSN-CNRS)

Composition du jury :

Catherine LAVAUD
Elisabeth SEGUIN
Philippe RASOANAIVO
Erwan POUPON

Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardennes
Professeur à l'Université de Rouen
Professeur à l'Institut Malgache de Recherches Appliquées
Professeur à l'Université Paris-Sud

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

« On appelle d'ordinaire inutiles les choses que l'on ne comprend pas. C'est une espèce de vengeance, et comme généralement les mathématiques et la physique ne sont pas comprises, elles sont déclarées inutiles. »

- **Fontenelle**

Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés à activité antiplasmodiale, deux plantes de Madagascar ont été étudiées : *Pyrostria major* (Rubiaceae) et *Gonioma malagasy* (Apocynaceae). Leurs extraits acétate d'éthyle et alcaloïdique ont montré une activité antiplasmodiale significative vis-à-vis de la souche chloroquino-résistante FcB1 lors d'un criblage préliminaire.

L'étude phytochimique des feuilles de *P. major* a conduit à l'isolement du β sitostérol ainsi que de huit nouveaux diarylheptanoïdes glycosylés, décrits pour la première fois dans une plante appartenant à la famille des Rubiaceae. L'activité antiplasmodiale de l'extrait AcOEt des feuilles est probablement due à la présence du β sitostérol. Cette activité serait due à l'effet stomatocytogénique provoqué par cette famille de composés. L'utilisation de l'"Exciton chirality" a permis de déterminer la configuration absolue des diarylheptanoïdes glycosylés isolés. Cette étude structurale nous a permis d'obtenir d'une part, deux composés antiplasmodiaux sélectifs et non cytotoxiques et d'autre part, un composé antileishmanien et un autre antitrypanosomal.

L'étude de l'extrait alcaloïdique de *G. malagasy* a conduit à l'isolement d'une nouvelle série chimique, "les goniomedines". Ces dernières sont caractérisées par un squelette bisindolique constitué de deux monomères dihydroindoliques reliés par une unité dihydropyrane. Une étude configurationnelle basée sur le calcul théorique de spectres de dichroïsme circulaire ainsi que sur des considérations biogénétiques, a permis la détermination de leur configuration absolue. Parmi ces composés, un seul a montré une activité antiplasmodiale significative.

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS, Gif-sur-Yvette, France). Je remercie le Professeur David Crich de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse à l'Institut, et je remercie le CNRS, pour le financement (bourse BDI) qui m'a été accordé.

Je remercie chaleureusement les Docteurs Françoise Guéritte et Marc Litaudon, mes directeurs de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et m'avoir donné la possibilité de mener à bien ce travail de thèse. Je les remercie aussi pour les connaissances que j'ai pu acquérir et la confiance qu'ils m'ont accordée durant ces trois dernières années.

Je tiens également à adresser mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger mon travail :

Le Professeur Catherine Lavaud, Professeur à la faculté de Pharmacie de l'Université de Reims Champagne Ardennes.

Le Professeur Élisabeth Seguin, Professeur à la faculté de Pharmacie de l'Université de Rouen.

Le Professeur Erwan Poupon, Professeur à la faculté de Pharmacie de l'Université Paris Sud.

Le Professeur Philippe Rasoanaivo, Professeur à l'Institut Malgache de Recherches Appliquées.

Ce travail doit aussi beaucoup à la contribution de différentes personnes de l'Institut :

Marie-Elise Tran Huu Dau pour les études de modélisation moléculaire et de dichroïsme circulaire ainsi que pour sa patience dans le long chemin de la détermination de la configuration absolue des goniomedines.

Marie-Thérèse Martin pour son expertise en RMN et l'énorme travail fourni sur les goniomedines. De plus, Marie-Thérèse m'a permis de connaître Mme Nicole Platzer, sa directrice de thèse. J'en profite pour la remercier pour sa patience et son aide durant l'élucidation structurale des goniomedines.

Je tiens à ajouter que ces travaux de thèse n'auraient pas été possibles sans les nombreuses plantes que le Pr. Rasoanaivo et son équipe nous ont gentiment envoyées tout au long de cette étude.

Les membres du service HPLC (Odile, Nathalie, Frank et Suzane) pour leurs conseils, leur gentillesse et leur bonne humeur durant les heures passées devant les CLHP préparatives.

Pascal Retailleau et ses nombreux conseils pour obtenir des cristaux à partir des goniomedines.

Geneviève Aubert pour les tests *in vitro* de cytotoxicité, ainsi que sa gentillesse et sa patience.

Les différents services communs de l'ICSN (RMN, spectroscopie de masse et informatique)

Ce travail aurait été incomplet sans la mise en place de collaborations essentielles, permettant notamment d'approfondir la partie pharmacologique de cette étude. Pour cela, je remercie le Pr. Philippe Grellier et le Dr. Elizabeth Mouray du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris qui m'ont accueilli chaleureusement dans leur laboratoire et m'ont permis d'effectuer les tests biologiques sur le *Plasmodium falciparum*. Les professeurs Philippe Loiseau et Christian Bories pour l'évaluation des activités antileishmanienne et antitrypanosomale des diarylheptanoïdes.

Je tiens à remercier le professeur Denis Merlet ainsi que le Dr Christie Aroulanda de l'équipe de RMN en milieu orienté de l'Université Paris-Sud, pour les nombreuses expériences effectuées dans leur laboratoire afin de déterminer la configuration relative de la goniomedine A.

Je tiens à remercier également le Dr Alexandre Maciuck pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry pour expérimenter sa technique de recherche de composés antiplasmodiaux par spectrométrie de masse.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Je tiens à remercier particulièrement tous les membres de mon équipe pour leur soutien, leur conseils et leur aide : les "chefs", Fanny et Vincent, mais aussi les étudiants, IR, IE... (Pierre-Marie, Mélanie, Aurélie, Louis-Félix, Charlotte, Camille, Estella, Cécile, Erell, Paule, Barbara, Maéva, Anne-Laure, Claire, Jérémy, Olga, Dominique, Sandy, Florent ...), qui ont contribué à la bonne humeur du labo et aux bons souvenirs que j'aurai de ces trois ans.

Je n'oublie pas les membres des équipes Guillou (Mélanie, Elvina, Laurent, Xavier) et Dubois (Damien, Marion, Débora et Guillaume) ainsi que les membres du CEI dont je n'ai pas fait partie (Simon, Amandine et Hélène) pour les moments passés ensemble.

Je tiens à remercier toutes les personnes à l'ombre de ce travail : mes amis, qui m'ont soutenu et épaulé pendant trois ans, et bien sûr ma famille, en particulier mes frères et mes parents, qui m'ont toujours encouragé pendant mes études et sans qui je n'aurais pas pu réaliser ce travail.

Enfin, je dédie ce travail à ma chère et tendre épouse, Lyly, en remerciement de son soutien, son amour et sa douceur tout au long de cette thèse.

Table des matières

Résumé	5
Remerciements	7
Table des matières	11
Liste des figures	17
Liste des tableaux	22
Liste des abréviations	23
INTRODUCTION GENERALE	27
I-PARTIE INTRODUCTIVE	33
1-Le paludisme et la recherche de composés antipaludiques	35
1.1 Le paludisme	35
1.1.1 Généralités	35
1.1.2 La lutte antipaludique	36
1.1.2.1 La lutte anti-vectorielle	36
1.1.2.2 La thérapie vaccinale	36
1.1.2.3 La chimiothérapie	37
1.1.2.3.1 L'arsenal antimalarique actuel	37
1.1.2.3.2 Molécules antimalariques en développement	42
1.2 La recherche actuelle de composés antipaludiques	48
1.2.1 État de la recherche antipaludique	48
1.2.2 Les différentes approches conduisant à la découverte de nouveaux candidats antimalariques	49
1.2.2.1 Le criblage de chimiothèques	49
1.2.2.2 Le criblage de médicaments connus	56
1.2.2.3 Le criblage d'extraits naturels	57
2-Présentation du projet	60
2.1 Environnement du projet	60
2.2. L'essai biologique	60
2.3 Résultats préliminaires	60
2.4 Plantes sélectionnées pour l'étude	61
II-PYROSTRIA MAJOR : ÉTUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE	63

1-Étude bibliographique	65
1.1 La famille des Rubiaceae	65
1.1.1 Classification des Rubiaceae	65
1.1.2 Répartition géographique	65
1.1.3 Intérêt économique et utilisations traditionnelles	66
1.2 Le genre <i>Pyrostria</i> et l'espèce <i>Pyrostria major</i>	66
1.2.1 Description botanique	66
1.2.1.1 Le genre <i>Pyrostria</i>	66
1.2.1.2 L'espèce <i>Pyrostria major</i> (A. Rich. ex DC.) Cavaco	67
1.2.2 Répartition géographique	67
1.2.3 Utilisations traditionnelles	68
1.3 Composition chimique du genre <i>Pyrostria</i>	68
1.3.1 Les Diarylheptanoïdes	68
1.3.1.1 Type 1 : Diarylheptanoïdes linéaires non phénoliques	69
1.3.1.2 Type 2 : Diarylheptanoïdes linéaires phénoliques	69
1.3.1.3 Type 3 : Diarylheptanoïdes macrocycliques	73
1.3.1.4 Type 4 : Diaryletherheptanoïdes macrocycliques	73
1.3.1.5 Type 5 : Diarylheptanoïdes à chaînes cyclisées	74
2-Travaux personnels	77
2.1 Étude phytochimique de <i>Pyrostria major</i>	77
2.1.1 Récolte et identification	77
2.1.2 Extraction et purification des diarylheptanoïdes glycosylés	77
2.1.3 Caractérisation des composés isolés	81
2.1.3.1 Le composé 1	81
2.1.3.2 Le composé 2	85
2.1.3.3 Le composé 3	85
2.1.3.4 Le composé 4	86
2.1.3.5 Le composé 5	87
2.1.3.6 Le composé 6	87
2.1.3.7 Le composé 7	89
2.1.3.8 Le composé 8	90
2.2 Détermination de la configuration absolue des diarylheptanoïdes glycosylés	91
2.2.1 L'"Exciton chirality"	91
2.2.1.2 Théorie de l'"Exciton chirality"	91
2.2.1.3 Règles d'interprétation du spectre de DC	92
2.2.1.4 Applications de l'EC aux systèmes 1,3 dibenzoate acycliques ¹¹⁸	93
2.2.2 Application de l'EC au composé 1 (54)	94
2.2.3 Application de l'EC au composé 2 (55)	96
2.2.4 Application de l'EC au composé 3 (56)	97
2.2.5 Application de l'EC au composé 4 (57)	97
2.2.6 Stéréochimie des composés 5, 6, 7 et 8	99
2.3 Activités biologiques	100
2.3.1 Activité antiplasmodiale du β -sitostérol	100
2.3.2 Activités antiplasmodiale et cytotoxique des diarylheptanoïdes	102
2.3.3 Activités antileishmanienne et antitrypanosomale	103

3-Conclusion de la Partie II	105
III-GONIOMA MALAGASY: ÉTUDES CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE	107
1-Étude bibliographique	109
1.1 Famille des Apocynaceae	109
1.1.1 Classification des Apocynaceae	109
1.1.2 Répartition géographique	109
1.1.3 Critères de reconnaissance	110
1.2 Le genre <i>Gonioma</i> et l'espèce <i>malagasy</i>	111
1.2.1 Description botanique	111
1.2.1.1 Le genre <i>Gonioma</i>	111
1.2.1.2 L'espèce <i>Gonioma malagasy</i>	111
1.2.2 Répartition géographique	114
1.2.3 Utilisations traditionnelles	114
1.3 Composition chimique du genre <i>Gonioma</i>	115
1.3.1 Alcaloïdes de l'espèce <i>G. kamassi</i>	115
1.3.2 Alcaloïdes de l'espèce <i>G. malagasy</i>	116
1.3.2.1 La goniomine	116
1.3.2.2 La goniomitine	118
1.3.2.3 La pleiomutinine	119
1.4 Bisindoles à pont méthylène	119
1.4.1 Indole-Indole et apparentés	119
1.4.1.1 Alcaloïdes du genre <i>Murraya</i>	119
1.4.1.2 Alcaloïdes du genre <i>Arundo</i>	120
1.4.2 Corynane-Tryptamine	121
1.4.3 Vobasine-Vobasine	122
1.4.4 Alcaloïdes du genre <i>Alstonia</i>	123
1.4.5 Ajmaline-Ajmaline	124
1.4.6 Strychnane-Strychnane	124
1.4.7 Apparicine-Vobasine	125
1.4.8 Aspidospermane-Pleiocarpamine	126
1.4.9 Aspidospermane-Ibogane	127
1.4.10 Aspidospermane-Aspidospermane	128
1.4.11 Aspidospermane-Eburnane	129
1.4.12 Eburnane-Eburnane	131
2-Travaux personnels	132
2.1 Étude phytochimique de <i>Gonioma malagasy</i>	132
2.1.1 Récolte et identification	132
2.1.2 Extraction et purification d'une nouvelle série de bisindoles	133
2.1.2.1 Extrait d'écorces	133
2.1.2.2 Extrait des feuilles	135
2.1.2.3 Bilan des extractions	135
2.1.3 Caractérisation des composés isolés	139
2.1.3.1 Goniomedine A	139
2.1.3.2 Goniomedine B	144

2.1.3.3 Goniomedine C	147
2.1.3.4 Goniomedine D	148
2.1.3.5 Goniomedine E	150
2.1.3.5 Contre-ion des goniomedines (A, C-E)	151
2.2 Détermination de la configuration absolue des goniomedines	152
2.2.1 Goniomedine A	152
2.2.2 Goniomedine B	158
2.2.3 Goniomedine C	159
2.2.4 Goniomedine D	160
2.2.5 Goniomedine E	161
2.3 Biosynthèse des goniomedines	163
2.4 Activités biologiques	165
2.4.1 Activités antiplasmodiale et cytotoxique des composés isolés de <i>G. malagasy</i>	165
3-Conclusion de la partie III	167
CONCLUSION GENERALE	169
IV-PARTIE EXPERIMENTALE	175
1-Procédures générales	177
1.1 Solvants et réactifs	177
1.2 Fractionnements, purifications et suivi des réactions	177
1.2.1 Chromatographie sur couches minces (CCM)	177
1.2.2 Chromatographie sur colonne (CC)	177
1.2.3 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	178
1.2.3.1 CLHP en phase inverse	178
1.2.3.2 CLHP-SM	178
1.2.3.3 SFC	178
1.3 Analyses physiques et spectrales des composés	179
1.3.1 Pouvoir rotatoire	179
1.3.2 Dichroïsme circulaire	179
1.3.3 Spectrométrie ultra-violet (UV)	179
1.3.4 Spectrométrie infra-rouge (IR)	179
1.3.5 Spectrométrie de masse	180
1.3.6 Résonance magnétique nucléaire (RMN)	180
1.4 Calculs théoriques et génération des courbes de DC	181
2-Extractions, isoléments et purifications	182
2.1 <i>Pyrostria major</i> Cavaco.	182
2.2 <i>Gonioma malagasy</i> Boiteau	184
2.2.1 Extrait d'écorces	184
2.2.2 Extrait de feuilles	185

3-Caractéristiques physiques et spectrales des produits naturels	188
3.1 <i>Pyrostria major</i> Cavaco.	188
3.2 <i>Gonioma malagasy</i> Boiteau	197
4-Modes opératoires et caractéristiques physiques et spectrales des composés hémisynthétiques	207
5-Essais biologiques	225
5.1 Évaluation de l'activité antiplasmodiale	225
5.1.1 Culture <i>in vitro</i> de la phase intraérythrocytaire de <i>P. falciparum</i>	225
5.1.2 Évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antipaludique de molécules ou d'extraits en plaque multipuits	226
5.2 Évaluation de la cytotoxicité sur cellules KB, HL-60 et MRC-5	227
5.3 Évaluation de l'activité antileishmanienne	228
5.4 Évaluation de l'activité antitrypanosomale	229
Bibliographie	231
ANNEXES	244
Annexe 1 : Arbre phylogénétique des angiospermes (APG III)	246
Annexe 2 : Spectres RMN 1D (¹ H, ¹³ C et DEPT-135) et 2D (COSY, HMQC et HMBC) du composé 54	250
Annexe 3 : Spectres RMN ¹ H, ¹³ C et DEPT-135 des composés 55-61 et Spectre NOESY du composé 59	256
Annexe 4 : Composés isolés des feuilles de <i>Pyrostria major</i> (54-61) et composés hémisynthétiques (62-70)	267
Annexe 5 : Spectres RMN 1D (¹ H, ¹³ C) et 2D (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC et ROESY) de la goniomedine A	268
Annexe 6 : Spectres RMN 1D (¹ H, ¹³ C) et 2D (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC et ROESY) de la goniomedine B	278
Annexe 7 : Spectres RMN ¹ H et ¹³ C des goniomedines C-E	288

Annexe 8 : Données RMN ^1H et ^{13}C des goniomedines de <i>Gonioma malagasy</i>	297
Annexe 9 : Composés isolés des écorces de <i>Gonioma malagasy</i>	299
PUBLICATIONS	300

Liste des figures

Figure 1. Produits naturels et molécules synthétiques	37
Figure 2. Mécanisme de formation d'un adduit covalent d'hème et d'artémisinine	39
Figure 3. Schéma simplifié de la synthèse d'artémisinine à partir de l'acide dihydroartémisinique ²³	40
Figure 4. Coartem®	40
Figure 5. Antibiotiques antipaludiques.....	41
Figure 6. Fansidar®	42
Figure 7. Schéma récapitulatif des projets antimalariques dans le monde (1 ^{er} trimestre 2012, MMV).....	43
Figure 8. Schéma indiquant le nombre de candidats en phase préclinique et phase IV (MMV, 2012).....	43
Figure 9. La stratégie molécules hybrides	44
Figure 10. Structure des ozonides	45
Figure 11. Structure du NITD 609	46
Figure 12. Structure de la strictosamide	46
Figure 13. Photo d' <i>Argemone mexicana</i> ⁴⁵	47
Figure 14. Structure des trois ingrédients actifs contenus dans <i>Argemone mexicana</i>	47
Figure 15. Criblage virtuel d'une chimiothèque pour identifier de nouveaux antimalariques	50
Figure 16. Structures de molécules inhibitrices de l'enzyme PfNDH2.....	50
Figure 17. Structure d'un triazolopyrimidine	51
Figure 18. "Malaria box" (MMV).....	55
Figure 19. Structure de l'Astemizole.....	56
Figure 20. Structure du Psammaphysin H	57
Figure 21. Répartition géographique des Rubiaceae	65
Figure 22. Photos de <i>Pyrostria major</i> -Photos IMRA®	67
Figure 23. Répartition de <i>Pyrostria major</i>	67
Figure 24. Structures de diarylheptanoïdes du type 1	69
Figure 25. Structure de la curcumine.....	70
Figure 26. Exemples de structures de diarylheptanoïdes de type 2 monomères	71
Figure 27. Structure de l'alpinoïde A.....	71
Figure 28. Structures de diarylheptanoïdes hétérodimères.....	72
Figure 29. Structures de diarylheptanoïdes du type 3	73

Figure 30. Structures de diaryletherheptanoïdes	74
Figure 31. Structures de diarylheptanoïdes monomères du type 5	75
Figure 32. Structure d'un diarylheptanoïde dimère du type 5.....	75
Figure 33. Structure de diarylheptanoïdes hybrides du type 5.....	76
Figure 34. Carte de Madagascar, localisation du lieu de récolte à Mahanoro (A).....	77
Figure 35. Schéma de purification des composés isolés des feuilles de <i>Pyrostria major</i> et activité biologique sur FcB1 (exprimée en pourcentage d'inhibition à 1 µg/mL pour les fractions ou en CI ₅₀ µM pour les produits purs)	79
Figure 36. Composés isolés des feuilles de <i>Pyrostria major</i>	80
Figure 37. Structure plane du composé 1 (54)	81
Figure 38. Spectre RMN ¹ H (500 MHz) du composé 1 (54) dans le CD ₃ OD.....	82
Figure 39. Spectres RMN ¹³ C (en noir) et DEPT 135 (en vert) (125 MHz) du composé 1 (54) dans le CD ₃ OD.	82
Figure 40. Chromatogramme de l'analyse par SFC des témoins (D- et L-glucose) et de l'échantillon (détection DEDL).	84
Figure 41. Structure plane du composé 2 (55)	85
Figure 42. Structure plane du composé 3 (56)	85
Figure 43. Structure plane du composé 4 (57)	86
Figure 44. Structure plane du composé 5 (58)	87
Figure 45. Structure plane du composé 6 (59)	87
Figure 46. Agrandissement du spectre NOESY (500 MHz, CD ₃ OD) du composé 6	88
Figure 47. Structure plane du composé 7 (60)	89
Figure 48. Comparaison des spectres RMN du ¹ H des composés 3 (en vert) et 7 (en noir)	89
Figure 49. Structure plane du composé 8 (61)	90
Figure 50. Interaction du moment dipolaire de deux chromophores dans l'espace ¹²⁰	92
Figure 51. Split de Davydov ¹²⁰	92
Figure 52. Signes de chiralité et signes d'effet Cotton	93
Figure 53. Différentes conformations du motif 1,3 dibenzoate (<i>syn</i> en haut) et (<i>anti</i> en bas).....	94
Figure 54. Signes de chiralités des deux conformations <i>anti</i>	94
Figure 55. Dérivatisation du composé 1 (54)	95
Figure 56. Spectre de DC du composé 63.....	95
Figure 57. Dérivatisation du composé 2 (55)	96
Figure 58. Spectre de DC du composé 66 (Ethanol)	96
Figure 59. Dérivatisation du composé 3 (56)	97

Figure 60. Dérivatisation du composé 4 (57)	98
Figure 61. Superposition des spectres de DC du composé 70 (en rouge) et du composé 66 (en vert)	98
Figure 62. Stéréochimie des composés isolés de <i>Pyrostria major</i>	99
Figure 63. Structures du β -sitostérol (71) et du lupéol (72).....	100
Figure 64. Effet de l'incubation du lupéol sur des globules rouges sains	101
Figure 65. Formation des stomatocytes et des échinocytes	101
Figure 66. Répartition géographique des Apocynaceae.....	110
Figure 67. Planche botanique des parties de <i>Gonioma malagasy</i>	112
Figure 68. Photo de l'arbre <i>Gonioma malagasy</i> –Photo : IMRA®	113
Figure 69. Photo des feuilles de <i>Gonioma malagasy</i> –Photo : IMRA®	113
Figure 70. Localisation géographique de <i>G. malagasy</i> (point jaune) et de <i>G. kamassi</i> (point rouge)	114
Figure 71. Structures d'alcaloïdes isolés de <i>G. kamassi</i>	115
Figure 72. Structures d'alcaloïdes isolés de <i>G. malagasy</i>	116
Figure 73. Hypothèse biosynthétique de la goniomine (78)	117
Figure 74. Hypothèse biosynthétique de la quinine (1) et de la camptothecine (85)	117
Figure 75. Hypothèse biosynthétique de la (-)-goniomitine (79).....	118
Figure 76. Hypothèse biosynthétique de la bismurrayafoline A (88).....	120
Figure 77. Structure de l'arundine (89).....	120
Figure 78. Structure de la cynchophilline (90)	121
Figure 79. Hypothèse biosynthétique de la cynchophilline (90).....	121
Figure 80. Structure de la gardmultine (94)	122
Figure 81. Hypothèse biosynthétique de la gardmultine (94)	122
Figure 82. Structure de la villalstonine (97)	123
Figure 83. Hypothèse biosynthétique de la villalstonine (97)	123
Figure 84. Structures de la raureflexine (100) et de la rauflexine (101)	124
Figure 85. Structure de la bisleucocurine A (102).....	124
Figure 86. Hypothèse biosynthétique de la bisleucocurine A (102).....	125
Figure 87. Structures de la monogagine (107)	126
Figure 88. Structures de l'apparicine (108) et du vobasinol (109)	126
Figure 89. Structure de la pycnanthinine (110)	126
Figure 90. Hypothèse biosynthétique de la pycnanthinine (110)	127
Figure 91. Structure de la biscarpamontamine A (115)	127

Figure 92. Hypothèse biosynthétique de la biscarpamontamine A (115)	128
Figure 93. Structures de bisindoles à squelette aspidospermane-aspidospermane	128
Figure 94. Structure de la (-)-mehranine (122).....	129
Figure 95. Hypothèse biosynthétique et structure de la callichiline (123).....	130
Figure 96. Structures des bisindoles de <i>Melodinus celastroides</i>	131
Figure 97. Carte de Madagascar, localisation du lieu de récolte à Sakaraha (point rouge)	132
Figure 98. Structures des composés isolés de <i>G. malagasy</i>	134
Figure 99. Schéma de purification des composés isolés à partir des extraits alcaloïdique et éthanolique des écorces de <i>Gonioma malagasy</i> , et activité biologique sur FcB1 (exprimée en pourcentage d'inhibition à 10 µg/mL ou en CI ₅₀ en µM)	136
Figure 100. Schéma d'obtention de la (-)-quebrachamine (76) de l'extrait alcaloïdique des feuilles de <i>Gonioma malagasy</i>	137
Figure 101. Structure plane de la goniomedine A (128)	139
Figure 102. Spectre de masse basse résolution de la goniomedine A (128)	140
Figure 103. Agrandissement du massif isotopique du pic à m/z 325,2.....	140
Figure 104. Spectre RMN ¹ H (600 MHz) de la goniomedine A (128) dans le DMF- <i>d</i> ₇	142
Figure 105. Spectre RMN ¹³ C (150 MHz) de la goniomedine A (128) dans le DMF- <i>d</i> ₇	142
Figure 106. Principales corrélations HMBC et COSY de la goniomedine A (128).....	143
Figure 107. Structure plane de la goniomedine B (129)	144
Figure 108. Superposition des spectres RMN ¹ H (600 MHz, DMF- <i>d</i> ₇) de la goniomedine B (en vert) et de la goniomedine A (en noir).....	145
Figure 109. Corrélations TOCSY (600 MHz, DMF- <i>d</i> ₇) du proton H-4'	146
Figure 110. Signaux de l'anion trifluoroacétate sur le spectre RMN ¹³ C (150 MHz, DMF- <i>d</i> ₇) de la goniomedine B.....	146
Figure 111. Structure plane de la goniomedine C (130)	147
Figure 112. Structure plane de la goniomedine D (131).....	148
Figure 113. Superposition des spectres RMN ¹ H (600 MHz, DMF- <i>d</i> ₇) de la goniomedine D (en noir) et de la goniomedine A (en vert)	148
Figure 114. Principales corrélations HMBC et COSY de la goniomedine D (131)	149
Figure 115. Structure plane de la goniomedine E (132)	150
Figure 116. Superposition des spectres RMN ¹ H (600 MHz, DMF- <i>d</i> ₇) de la goniomedine E (en vert) et de la goniomedine A (en noir) et agrandissement du système AB de la goniomedine E	150
Figure 117. Centres asymétriques de la goniomedine A (128)	152

Figure 118. Principales corrélations ROESY de l'unité dihydropleiocarpamine (double flèche bleue).....	152
Figure 119. Principales corrélations ROESY de l'unité rhazidine (double flèche bleue)	153
Figure 120. Stéréoisomères possibles de la goniomedine A (128a-128d) et leurs stéréochimies respectives	154
Figure 121. Distances entre les unités constitutives de deux diastéréoisomères possibles de la goniomedine A	154
Figure 122. Conformère optimisé de la goniomedine A et corrélations ROESY (128d).....	156
Figure 123. Courbes de DC calculées des 4 stéréoisomères (128a-128d) en rouge et courbe de DC expérimentale de la goniomedine A (128) en noir	156
Figure 124. Hémisynthèse de la (+)-rhazidine (137).....	157
Figure 125. Obtention de la goniomedine A (128) à partir de la goniomedine B (129)	157
Figure 126. Centres asymétriques de la goniomedine B (129).....	158
Figure 127. Corrélations ROESY de la goniomedine B (129).....	158
Figure 128. Centres asymétriques de la goniomedine C (130).....	159
Figure 129. Courbes de DC calculées des 4 stéréoisomères (130a-130d) en rouge et bleu et courbe de DC expérimentale de la goniomedine C (130) en noir	160
Figure 130. Centres asymétriques de la goniomedine D (131)	160
Figure 131. Comparaison spectre de DC de la goniomedine A (rouge) et de la goniomedine D (noir).....	161
Figure 132. Centres asymétriques de la goniomedine E (132).....	161
Figure 133. Principales corrélations ROESY de l'unité dihydropleiocarpamine chlorée (double flèche bleue).....	162
Figure 134. Comparaison des spectres de DC de la goniomedine A (rouge) et de la goniomedine E (noir).....	162
Figure 135. Hypothèse biosynthétique des goniomedines	163
Figure 136. Schéma d'extraction des composés isolés des feuilles de <i>Pyrostria major</i> et activités biologiques vis à vis du <i>Plasmodium falciparum</i> (exprimées en % d'inhibition à 1 µg/mL et CI ₅₀ µM)	183
Figure 137. Schéma de fractionnement des écorces de <i>G. malagasy</i>	186
Figure 138. Schéma de fractionnement de l'extrait alcaloïdique des feuilles de <i>G. malagasy</i>	187
Figure 139. Structures des diarylheptanoïdes glycosylés isolés des feuilles de <i>Pyrostria major</i>	188
Figure 140. Structures des composés isolés de <i>G. malagasy</i>	197
Figure 141. Arbre phylogénétique des angiospermes	248

Liste des tableaux

Tableau I. Structures des molécules prioritaires de chaque groupe	53
Tableau II. Données RMN du composé 1 (54) (CD ₃ OD, 500 MHz).....	83
Tableau III. Activité biologique des 16 fractions de <i>Pyrostria major</i> sur FcB1 à 1 µg/mL	100
Tableau IV. Activités antiplasmodiale et cytotoxique des composés isolés de <i>Pyrostria major</i> et de leurs dérivés.....	102
Tableau V. Activités antileishmanienne et trypanosomale des composés isolés de <i>Pyrostria major</i> et de leurs dérivés	103
Tableau VI. Quantités obtenues et rendements d'extraction des composés isolés de <i>Gonioma malagasy</i>	135
Tableau VII. Données RMN de la goniomedine A (128) (DMF- <i>d</i> ₇ , 600 MHz).....	141
Tableau VIII. Activité biologique des 15 fractions de <i>G. malagasy</i> sur FcB1 à 10 µg/mL	165
Tableau IX. Activités antiplasmodiale et cytotoxique des composés isolés de <i>G. malagasy</i>	165
Tableau X. Références utilisées pour les déplacements chimiques.....	180

Liste des abréviations

#

26-L5 : Lignée cellulaire dérivant du cancer du colon

A

A-549 : Cellules cancéreuses du poumon

ACT : Artemisinin-based Combination Therapy

AcOEt : Acétate d'éthyle

AD : Colonne chirale avec une phase amylose

ANDi : Réseau Africain pour l'Innovation dans les Médicaments et les Diagnostics

APAB : Acide para-aminobenzoïque

APG : Angiosperm Phylogeny Group

C

CC : Chromatographie sur Colonne

CCE : Chromatographie sur Couche Epaisse

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CDCl₃ : Chloroforme deutéré

CI₅₀ : Concentration pour 50 % d'inhibition

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CLHP-MS : Chromatographie liquide Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse

CEM : Concentration Effectrice Minimale

CO₂ : Dioxyde de carbone

COSY : COrrrelation SpectroscopY

D

DA : Diels-Alder

DC : Dichroïsme Circulaire

DCE : Dichroïsme Circulaire Électronique

DCM : Dichlorométhane

DCV : Dichroïsme Circulaire Vibrationnelle

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DEDL : Détecteur à Diffusion de Lumière

DEPT-135 : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.

DHFR : DiHydroFolate Réductase

DHODH : DiHydroOrotate Dehydrogenase

DHPS : DiHydroPtéroate Synthase

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMD : Diméthyle dioxirane

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

δ_H : Déplacement chimique du proton

δ_C : Déplacement chimique du carbone

E

EC : Exciton Chirality

EMA : European Medicines Agency

éq. : équivalent

ESI : Ionisation en électronebulisation

Et₃N : Triéthylamine

EtOH : Éthanol

F

FcB1 : Souche colombienne du *Plasmodium falciparum* chloroquino-résistante

FDA : Food and Drug Administration

H

HDQ : 1-Hydroxy-2-Dodecyl-4-(1H) Quinolone

HCT-116 : Carcinomes du colon

HEK-293 : Human Embryonic Kidney (Épithélium Rénal Embryonnaire)

HEP G2 : Lignée cellulaire provenant d'un carcinome hépatocellulaire

HL-60 : Human Leukemia (Leucémie Humaine)

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HOP-92: Lignée cellulaire provenant d'un cancer du poumon non à petites cellules

HRP : Histidine Rich Protein

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

HT1080 : Lignée cellulaire humaine du fibrosarcome

I

IR : Infra-Rouge

IS : Indice de Sélectivité

K

K1 : Souche chloroquino-résistante du *Plasmodium falciparum*

KB : Cellules cancéreuses du nasopharynx

L

LDH : Lactate Déshydrogénase

LOX-IMVI : Lignée cellulaire provenant d'un mélanome

M

M : mol/L

MCDK : Madin-Darby Canine Kidney (lignée cellulaire provenant d'un cancer du rein)

MCF-7 : Michigan Cancer Foundation-7 (lignée cellulaire provenant d'un Cancer du sein)

MDA-MB-231 : Cellules cancéreuses de la poitrine

MDR : Multi-drug-resistance

MeOH : Méthanol

MeOD : Méthanol deutéré

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

mm : millimètre

MM₂ : Mecanic Molecular 2

MMV : Medecines for Malaria Venture

MRC-5 : Fibroblastes diploïdes de poumons fœtaux humains

MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

N

nm : Nanomètre

NADH : Forme réduite du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide)

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

NSCLC-N6 : Non Small Cell Lung Cancer cell line (Lignée cellulaire provenant d'un cancer du poumon non à petites cellules)

O

OD : Colonne chirale avec une phase cellulose

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PC-3M : Prostate Cancer (Lignée cellulaire provenant d'un cancer de la prostate)

PDA : Photo Diode Array

P-gp : P glycoprotein

PSN-p : Pôle Substances Naturelles – plantes

R

ROESY : Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

S

SERCA: Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium transport Atpase

SiOH : Silice

SFC : Super Critical Fluid Chromatography

SM(HR)-ESI : Spectrométrie de masse (Haute résolution) en mode électrospray

T

TA : Température Ambiante

TD-DFT : Time-dependent Density Functional Theory

TK-10 : Lignée cellulaire provenant d'un cancer du rein

TMS : Triméthylsilyl

U

UACC-62 : Lignée cellulaire provenant d'un melanome

UV : Ultra-Violet

Introduction générale

Depuis la plus haute antiquité, les êtres humains se sont appuyés sur la nature pour subvenir à leurs besoins de base. Pour des raisons pratiques d'accessibilité, les plantes ont constitué le socle de toutes les médecines traditionnelles connues. La plus ancienne provient de Mésopotamie et date de 2600 ans avant notre ère. Elle relate l'utilisation d'environ 1000 remèdes dérivées de plantes, dont beaucoup sont encore utilisées aujourd'hui pour le traitement de maux allant de la toux et du rhume, jusqu'aux infections parasitaires et inflammatoires.¹ Pour chaque civilisation, on peut recenser des textes décrivant les plantes et leurs usages. Lorsque l'on aborde la médecine traditionnelle égyptienne, les seules sources écrites dont nous disposons sont celles des papyrus médicaux rédigés pour la plupart en hiéroglyphes, la forme d'écriture des prêtres. Le plus important d'entre eux est sans aucun doute le papyrus Ebers, datant de 1500 ans avant J.C., qui décrit l'usage de plus de 850 plantes. La *materia medica* chinoise a été largement documentée au fil des siècles, avec le premier écrit datant d'environ 1100 ans avant J.C. (Wu Shi Er Bing Fang, contenant 52 ordonnances), suivi par des œuvres telles que le Shennong Herbal (1000 ans avant notre ère, 365 remèdes) et l'Herbal Tang (l'an 659, 850 remèdes). De même pour la médecine indienne ayurvédique qui date de 1000 ans avant notre ère (Charaka, Sushruta et Samhitas avec 341 et 516 remèdes, respectivement).

Les Grecs et les Romains ont sensiblement contribué au développement de l'utilisation rationnelle des remèdes à base de plantes dans la civilisation occidentale. Dioscoride, médecin grec, a décrit précisément la collecte, le stockage ainsi que l'utilisation des plantes médicinales au cours de ses voyages avec l'armée romaine, tandis que Galien, considéré comme l'un des pères de la pharmacie, était bien connu pour ses prescriptions et ses formulations complexes utilisées pour préparer des remèdes. Les arabes, quant à eux, ont préservé et enrichi une grande partie de l'héritage gréco-romain au cours du moyen âge, en y ajoutant leurs savoir-faire ainsi que certaines plantes médicinales chinoises et indiennes inconnues des grecs et des romains.²

Aujourd'hui, plus de 60% des médicaments commercialisés sont d'origine naturelle.³ Seulement 10 à 20 % de la flore mondiale ont été étudiés d'un point de vue phytochimique et le potentiel de cette ressource naturelle reste très important. La recherche de nouveaux principes actifs parmi les 250 000 espèces végétales recensées s'appuie essentiellement sur cinq grandes approches : l'ethnopharmacologie qui se base sur le recueil d'informations sur l'utilisation empirique et traditionnelle de la pharmacopée par les populations, la chimiotaxonomie qui vise des taxons connus pour leur activité biologique ou l'originalité de leurs métabolites secondaires, la zoopharmacologie qui s'attache à observer le comportement des animaux afin d'étudier les

¹ Borchardt, J. K. *Drug News Perspect.* **2002**, *15*, 187-192.

² <http://www.nlm.nih.gov/hmd/index.html>, **16/07/2012**

³ Newman, D. J. et al. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335.

plantes qu'ils ingèrent pour se soigner, les interactions plante-insecte qui s'intéressent aux plantes infestées par les insectes et à leur capacité d'adaptation, et enfin le criblage systématique des espèces, rendu possible ces dernières années grâce à la robotisation de nombreux essais biologiques.

Cependant, le criblage de produits naturels présente de nombreuses difficultés. On relèvera notamment les problèmes liés à législation régissant l'approvisionnement et l'accès à la biodiversité ou encore les variabilités saisonnières ou géographiques de la composition chimique des organismes étudiés. De plus, lorsque la ressource naturelle est accessible, et du fait de la complexité des extraits bruts, une activité biologique peut-être biaisée suite à de faux positifs ou de faux négatifs. En effet, les faux positifs peuvent être le résultat de nombreuses causes telles que des interactions hydrophobes non spécifiques, des composés faiblement solubles, des agents fluorescents ou dénaturants comme les tanins.⁴ Les faux négatifs, quant à eux, peuvent provenir d'une trop faible concentration du composé actif, de son instabilité chimique et/ou de la présence de composés possédant des activités antagonistes.

Les produits naturels, peu adaptés au criblage à haut débit pour les raisons qui viennent d'être citées, n'ont donc pas la faveur des industries pharmaceutiques dans leurs processus de recherche de substances bioactives. Ainsi, en termes de rentabilité, on peut dire sans aucun doute que les maladies infectieuses, dites négligées, et les courtes durées de traitements des antibiotiques associés sont des axes de recherche moins intéressants dès lors que ces maladies touchent essentiellement les pays pauvres. Dix maladies, dites négligées (neglected diseases) ont été listées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), il s'agit notamment de : la leishmaniose, la schistosomiase, l'onchocercose, la filariose, la maladie de Chagas, le paludisme, la lèpre, la trypanosomiase africaine, la tuberculose et la dengue.

Malgré les nombreuses raisons économiques qui peuvent pousser les industries pharmaceutiques à se désintéresser des maladies infectieuses, on notera tout de même, l'apparition, depuis les années 2000, de nombreuses initiatives (associations et fondations) visant à encourager la recherche de nouveaux médicaments contre le paludisme. Signalons, entre autres, le fruit d'un partenariat entre le DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative) et Sanofi-Aventis qui a conduit à la mise au point de l'ASAQ (une combinaison d'artésunate et d'amodiaquine).

Dans le cas du paludisme, les substances naturelles et leurs dérivés occupent une place prépondérante. En effet, l'arsenal thérapeutique antimalarique serait bien maigre sans la quinine et l'artémisinine, deux substances naturelles qui partagent leurs pharmacophores avec plus de 70 % des médicaments antimalariques actuels.

⁴ Verpoorte, R. *Drug Discovery Today* **1998**, 3, 232-238.

L'histoire de la lutte antipaludique démontre le rôle majeur des substances naturelles et de leurs potentialités antiparasitaires. De ce fait, la recherche de nouveaux composés antimalariques au sein de la biodiversité tropicale pour lutter contre les phénomènes de résistances, qui se développent de plus en plus rapidement, apparaît donc comme un sujet d'intérêt au sein d'un institut de recherche académique. Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans cette voie de recherche.

Suite à un criblage antiplasmodial d'extraits de diverses parties de plantes provenant de la biodiversité tropicale réalisé en collaboration avec l'équipe du Professeur Philippe Grellier (Museum National d'Histoire Naturelle), nous avons sélectionné deux plantes pour cette étude : *Pyrostria major* (Rubiaceae) et *Gonioma malagasy* (Apocynaceae).

Ce manuscrit est constitué de quatre parties. La partie introductive aura pour but de définir le cadre de cette étude en présentant les différentes stratégies permettant de découvrir de nouvelles molécules antimalariques ainsi que la méthodologie employée. Les parties 2 et 3 seront consacrées aux travaux phytochimiques entrepris sur *Pyrostria major* et *Gonioma malagasy*. Dans chaque partie, un chapitre ayant pour objet l'étude bibliographique du genre et de certains métabolites d'intérêt précédera le chapitre concernant l'étude phytochimique et les résultats biologiques obtenus. Une conclusion générale synthétisera l'apport de ce travail, présentera ses limites et proposera des perspectives de recherche. Enfin, la partie expérimentale décrira l'ensemble des matériels et méthodes employés durant ces travaux de thèse.

Première partie
I-Partie Introductive

1-Le paludisme et la recherche de composés antipaludiques

1.1 Le paludisme

1.1.1 Généralités

Le paludisme est une maladie infectieuse provoquée par des protozoaires, parasites du sang, appartenant au genre *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*). Cette maladie est transmise par un moustique, l'anophèle femelle, et se manifeste par des accès de fièvre intermittents. Depuis 2004,⁵ une cinquième espèce de *Plasmodium*, *P. knowlesi*, connue pour être responsable du paludisme simien, a été reconnue responsable d'infections humaines qu'il est recommandé de traiter comme *P. falciparum*.

Les dernières estimations de l'OMS⁶ font état de 216 millions d'épisodes palustres en 2010, dont 81% dans la région Afrique, soit 174 millions de cas. Le nombre de décès dus au paludisme est estimé à 655 000 pour l'année 2010, dont 91 % en Afrique. A l'échelle mondiale, 86 % des décès imputables au paludisme ont frappé des enfants de moins de 5 ans.

Dans les années 60, l'apparition des premières molécules antipaludiques efficaces et bon marché, associées à une lutte antivectorielle à grande échelle (principalement par l'épandage massif de dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT) a permis de réduire considérablement la morbidité due à cette maladie.

Cependant, l'emploi massif et systématique de ces produits a conduit en quelques années à l'apparition de résistances du vecteur au DDT et à l'émergence de parasites résistants aux antipaludiques utilisés à l'époque. On observe depuis, une nette recrudescence de la maladie, principalement dans les pays du sud.

Plusieurs facteurs expliquent la situation actuelle. Tout d'abord, le manque d'infrastructures dans les pays les plus touchés limite l'efficacité des programmes de prévention et de distribution des médicaments. Par ailleurs, la recherche et le développement de thérapies efficaces sont peu profitables pour les grandes industries pharmaceutiques, au regard de la solvabilité limitée des populations à risque. Enfin, les changements environnementaux tels que le réchauffement climatique,⁷ l'exploitation de sites autrefois préservés, ou encore le déplacement des populations lors de conflits ou de problèmes économiques contribuent à la forte extension de cette maladie dans la plupart des pays de la zone intertropicale.

⁵ Singh, B. et al. *Lancet* **2004**, *363*, 1017-1024.

⁶ World Malaria Report de http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/fr/ (Organisation Mondiale de la Santé), **2011**

⁷ Smol, J. P. *Nature* **2012**, *483*, S12-S15.

1.1.2 La lutte antipaludique

1.1.2.1 La lutte anti-vectorielle

L'apparition de souches d'anophèles résistantes au DDT, en 1969, a conduit à l'abandon de l'utilisation de ce dernier. Dès lors, des mesures multi-échelles adaptées aux conditions locales ont été privilégiées :

- Lutte biologique : dernièrement, la dispersion d'anophèles mâles stériles dans l'environnement ainsi que des interventions génétiques sur les espèces vectrices par introduction de gènes inhibant le cycle sporogonique sont à l'essai⁸
- Mesures prophylactiques : distribution de crèmes répulsives et de moustiquaires imprégnées d'insecticides, ...

1.1.2.2 La thérapie vaccinale

Il n'y a toujours pas de vaccin disponible contre le paludisme.⁹ En effet, les tentatives de mise au point d'un vaccin antiplasmodial n'aboutissent toujours pas pour les raisons suivantes :

- L'absence de modèle animal fiable.
- La complexité du cycle du parasite chez l'homme : chaque stade du cycle parasitaire présente des antigènes différents.
- Les difficultés techniques des essais cliniques et les coûts de développement.

Cependant, depuis 1992, un vaccin antimérozoite prometteur appelé RTS, S/AS02A est en développement chez GlaxoSmithKline Biologicals. En effet, une étude récente¹⁰ montre que des injections expérimentales à de jeunes enfants divisent par deux le risque de développer la maladie, il s'agit d'un pourcentage significativement inférieur à celui obtenu avec d'autres vaccins, mais une amélioration importante pour certains experts, en comparaison avec la situation actuelle. De plus, si toutes les études et les tests continuent à se dérouler normalement, il pourrait être commercialisé d'ici la fin 2012.

Enfin, une étude récente¹¹ a démontré que parmi les récepteurs de surface des hématies permettant l'entrée des mérozoïtes, l'un d'eux, le basigin, est indispensable à cette pénétration. Ce récepteur devient de ce fait une cible potentielle pour la mise au point d'un vaccin.

⁸ Ito, J. et al. *Nature* **2002**, 417, 452-455.

⁹ Wells, T. N. C. et al. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, 8, 879-891.

¹⁰ Adrian, H. N. *Eng. J. Med.* **2012**, 366, 764-766.

¹¹ Crosnier, C. et al. *Nature* **2011**, 480, 534-537.

1.1.2.3 La chimiothérapie

1.1.2.3.1 L'arsenal antimalarique actuel

La chimiothérapie est la stratégie la plus aboutie pour lutter contre le paludisme, et cette dernière s'est grandement inspirée de trois produits naturels :¹² la quinine (1), le lapachol (4) et l'artémisinine (7) (Figure 1). Ces produits naturels ont été découverts, grâce à la médecine traditionnelle, isolés et optimisés par des programme de chimie médicinale afin d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques.

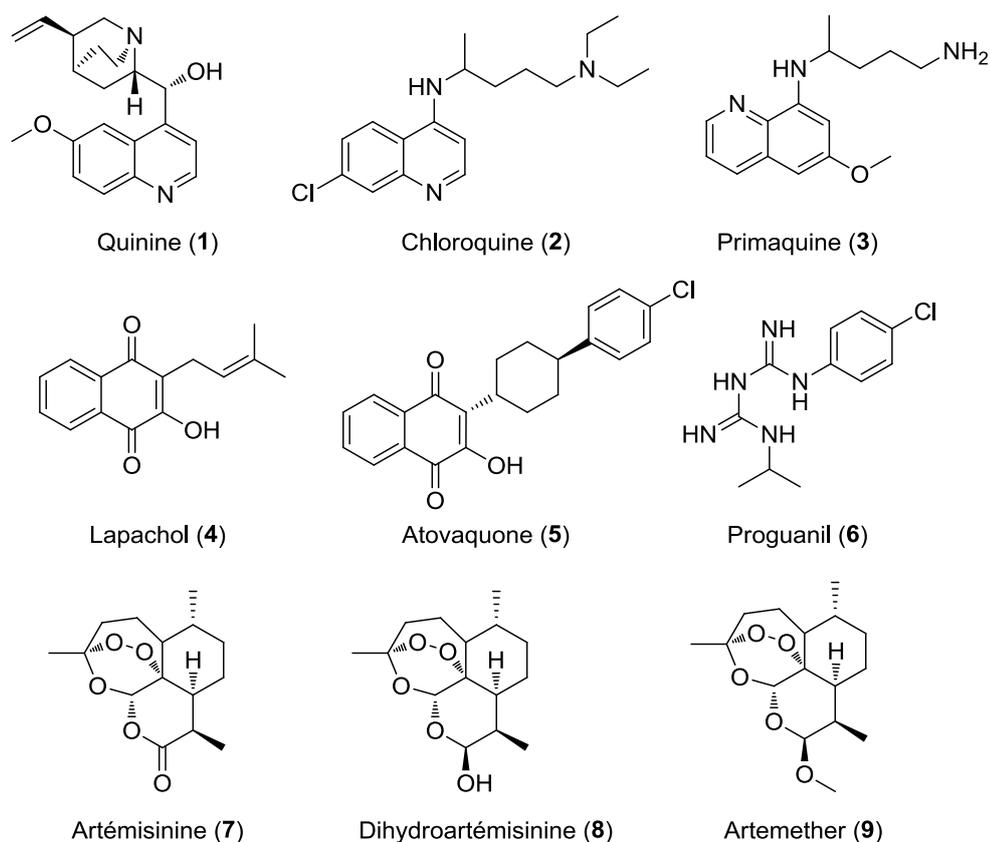


Figure 1. Produits naturels et molécules synthétiques

a- Les quinoléines

La première molécule antimalarique employée est la quinine (1), un alcaloïde extrait des écorces de *Cinchona calisaya*.¹³ Elle cause la mort du parasite en bloquant le mécanisme de détoxification¹⁴ de l'hème (Fe^{2+} -protoporphyrine IX) en hémazoïne (Fe^{3+} -protoporphyrine IX), toxique pour le parasite. Le fait que le mécanisme d'action de la quinine et de ses dérivés ne

¹² Wells, T. *Malaria. J.* **2011**, *10*, S3.

¹³ Wells, T. N. C. et al. dans: *Malaria: New Medicines for its Control and Eradication*, **2012**, 1-31

¹⁴ Weissbuch, I. et al. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4899-4914.

dépende pas d'une cible génétiquement codée, explique la raison pour laquelle les résistances ont mis du temps avant d'apparaître.

De plus il faut noter qu'à l'heure actuelle, seules les amino-8-quinoléines, telles que la primaquine (3) (Figure 1) sont efficaces sur les phases hépatiques et sur les gamétocytes.

b- Les naphthoquinones

Le lapachol (4) (Figure 1), est un dérivé de la naphthoquinone, naturellement présent dans l'arbre lapacho, utilisé pour traiter le paludisme en Amérique du sud.¹⁵ Les chercheurs se sont inspirés du motif hydroxynaphthoquinone pour synthétiser des dérivés plus actifs pouvant être utilisés *per os*, et surtout possédant une meilleure stabilité métabolique. Cela les a conduit à concevoir l'atovaquone (5),¹⁶ un des principes actifs du Malarone® (association atovaquone-proguanil(6)). Cette famille chimique de composés, analogues de l'ubiquinone, agit en inhibant le transport des électrons au niveau du cytochrome mitochondrial bc₁ (complexe III). L'utilisation en monothérapie de l'atovaquone engendre très rapidement des phénomènes de résistance.

c- L'artémisinine et ses dérivés

L'artémisinine (7) (*Qing hao su*), est une lactone sesquiterpénique découverte en 1972 par des scientifiques chinois.¹⁷ Ce composé, isolé des feuilles de l'armoise annuelle (*Artemisia annua*), possède un groupement endopéroxyde essentiel à son activité biologique. Les pharmacomodulations opérées sur l'artémisinine ont conduit à des analogues plus actifs tels que la dihydroartémisinine (8) et l'artemether (9). Les dérivés de l'artémisinine ont la particularité d'agir sur les souches résistantes du *P. falciparum*. Contrairement aux autres antimalariques, ils sont les seuls à être efficaces sur toutes les formes parasitaires du cycle intraérythrocytaire, empêchant ainsi les transmissions de l'homme au moustique.

Le mécanisme d'action de l'artémisinine reste controversé. En effet, certains¹⁸ pensent que le groupement endopéroxyde serait capable d'alkyler les protéines riches en histidine (HRP), bloquant ainsi la production d'hémozoïne, tandis que d'autres¹⁹ penchent plutôt pour un mécanisme d'alkylation de l'hème (adduit covalent Figure 2) à l'origine de radicaux libres hautement réactifs.²⁰

¹⁵ Carvalho, L. H. et al. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1988**, *21*, 485-487.

¹⁶ Hudson, A. T. *Parasitol. Today* **1993**, *9*, 66-68.

¹⁷ Klayman, D. L. *Science* **1985**, *228*, 1049-1055.

¹⁸ Sullivan, D. J. *Science* **1996**, *271*,

¹⁹ Robert, A. et al. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13676-13680.

²⁰ Robert, A. et al. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 167-174.

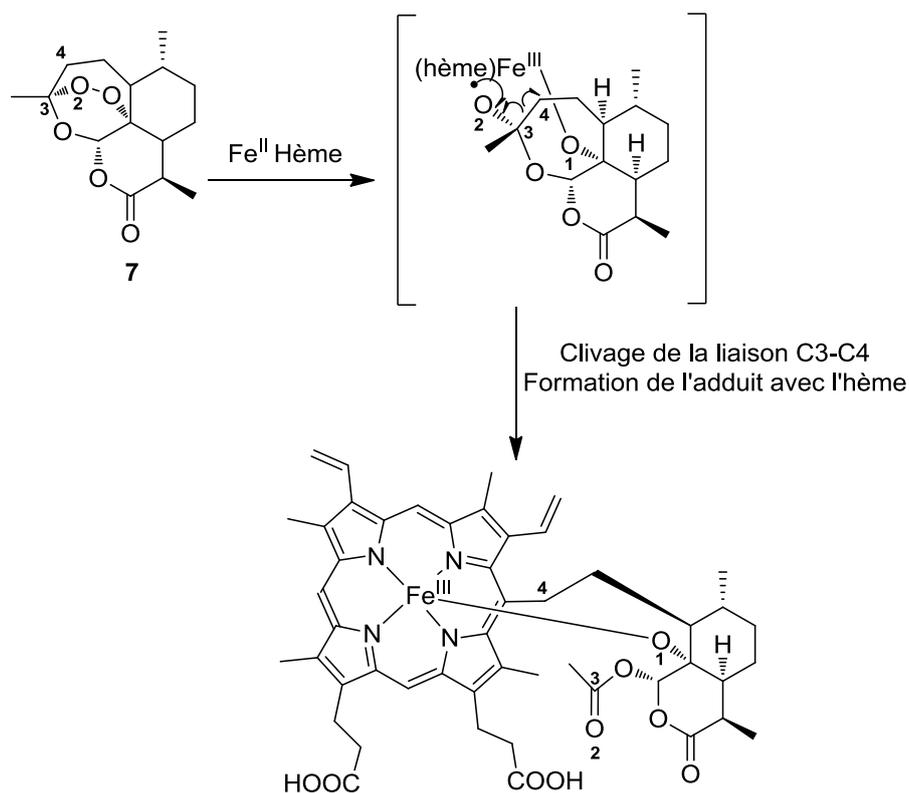


Figure 2. Mécanisme de formation d'un adduit covalent d'hème et d'artémisinine²¹

Les synthèses ou hémisynthèses d'artémisinine sont réalisables mais peu rentables²² à l'échelle industrielle. L'artémisinine est obtenue par extraction avec des rendements pouvant atteindre 0,8 % en Asie et 1,2 % en Afrique. Récemment, des chercheurs du Max-Planck Institut²³ viennent de faire renaître l'espoir de produire de l'artémisinine à moindre coût. En effet, lors de l'extraction de l'artémisinine, on isole une quantité 10 fois plus importante d'une molécule voisine, appelée acide artémisinique, dont on se débarrassait parce que sa conversion en artémisinine n'était pas rentable. Ce dernier est d'abord réduit en acide dihydroartémisinique puis transformé en artémisinine par une réaction de photooxydation en flux continu aboutissant à la création d'une liaison covalente entre deux atomes d'oxygène. Cette réaction ne prend que quelques minutes et présente un rendement de 40% (Figure 3).

Cette avancée abaisserait probablement les coûts de production, contribuant à faciliter l'accès des populations pauvres aux thérapies antipaludiques. Cependant, il subsiste un problème agronomique important conduisant de nombreux agriculteurs à se détourner de cette culture. Il faut, en effet, laisser croître la plante pendant au moins 1 an²⁴ avant d'en extraire les molécules

²¹ Meunier, B. et al. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1444-1451.

²² Covello, P. S. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2881-2885.

²³ Lévesque, F. et al. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 1706-1709.

²⁴ Kumar, S. et al. *Ind. Crop. Prod.* **2004**, *19*, 77-90.

d'intérêt. Cet inconvénient pourrait de ce fait limiter fortement la production de cette matière première.

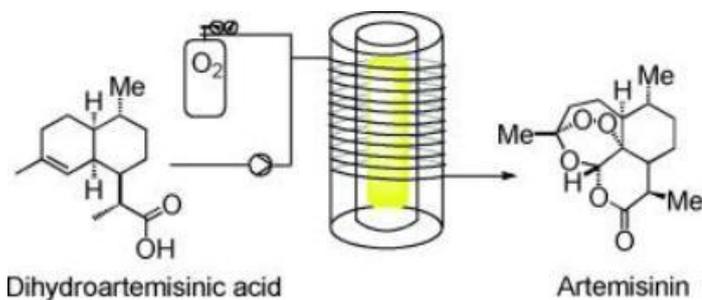


Figure 3. Schéma simplifié de la synthèse d'artémisinine à partir de l'acide dihydroartémisinique²³

d- Les ACT ("Artemisinin-based Combination Therapy")

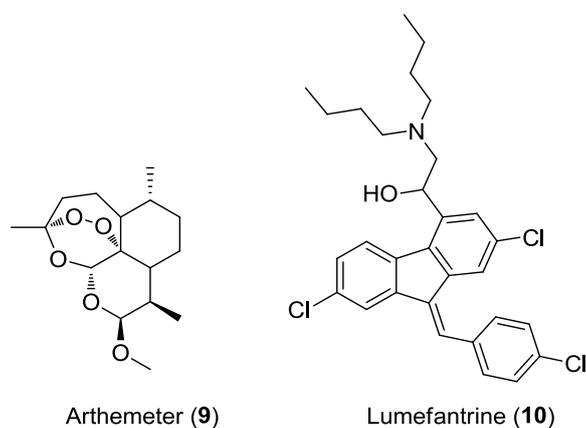


Figure 4. Coartem®

Les effets des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) ont été démontrés pour la première fois expérimentalement par Chawira et ses collaborateurs en 1987.²⁵ De plus, suite aux échecs des différentes molécules en monothérapie (chloroquine etc.) ainsi qu'aux résultats de nombreuses études²⁶ ayant prouvé l'effet positif des ACT en clinique, l'OMS, a revu ses recommandations concernant le traitement du paludisme à *P. falciparum* non compliqué. L'OMS préconise en particulier, que le traitement de choix du paludisme serait dorénavant des combinaisons de deux ou plusieurs molécules antimalariques possédant des mécanismes d'action différents.²⁷ Elle ira même jusqu'à suggérer l'interdiction d'employer l'artémisinine en monothérapie, pour protéger cette classe d'antimalarique contre l'émergence d'éventuelles résistances. Les ACT sont aujourd'hui considérées et employées comme traitement standard du

²⁵ Chawira, A. N. et al. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1987**, *81*, 554-558.

²⁶ Nosten, F. et al. *The Lancet* **2000**, *356*, 297-302.

²⁷ World Health Organization Guidelines for the Treatment of Malaria, **2006**

paludisme, avec comme premier exemple historique : la combinaison Artemether-Lumefantrine(**10**) (Coartem[®]). (Figure 4).

Même si les ACT représentent à l'heure actuelle les combinaisons médicamenteuses les plus efficaces, elles n'en restent pas moins sujettes aux résistances. En effet, des cas ont été recensés, récemment, au Cambodge, un site historique en matière d'émergences de résistances.²⁸

e- Les antibiotiques

Les antibiotiques inhibant les étapes précoces de la synthèse des protéines procaryotiques, tels que la Doxycycline (**11**) et la Clindamycine (**12**), ont trouvé une application non négligeable en chimiothérapie antipaludique. Cependant, leur utilisation reste limitée en Afrique, du fait qu'ils soient contre-indiqués chez l'enfant de moins de 8 ans.²⁹

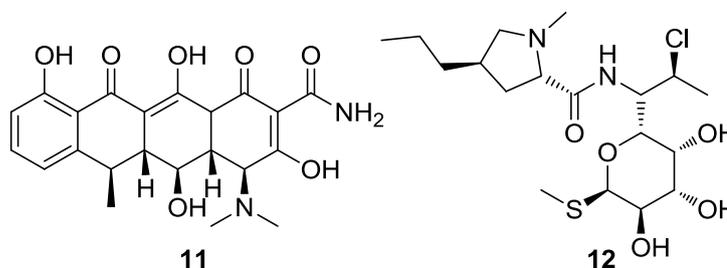


Figure 5. Antibiotiques antipaludiques

f- Les antifoliques

Il est clair que les antimalariques n'ont pas, tous, une origine naturelle. En effet, certains d'entre eux proviennent de ce qu'on appelle la conception rationnelle de molécules bioactives, issue de l'étude des voies métaboliques du *Plasmodium*. A titre d'exemple, le métabolisme de l'acide folique est connu pour être particulier chez les *Apicomplexa*,³⁰ car ce dernier est synthétisé à partir de l'acide *para*-aminobenzoïque (APAB) et de la ptérine. La dihydroptéroate synthase (DHPS), spécifique de ces parasites, permet la synthèse d'ADN, à partir du cycle de l'acide folique. De ce fait, les inhibiteurs de la DHPS, comme le sulfadoxine (**13**), et de la dihydrofolate réductase (DHFR), comme la pyriméthamine (**14**), sont de puissants antimalariques, particulièrement lorsqu'ils sont administrés en association (Fansidar[®]) (Figure 6).

²⁸ Dondorp, A. M. et al. *N. Eng. J. Med.* **2009**, *361*, 455-467.

²⁹ Ridley, R. G. *Nature* **2002**, *415*, 686-693.

³⁰ Organismes unicellulaires tous parasites de métazoaires, caractérisés par la présence d'un ADN chloroplastique vestigial.

Malheureusement, une utilisation abusive de cette association semble faire apparaître des résistances assez rapidement.³¹

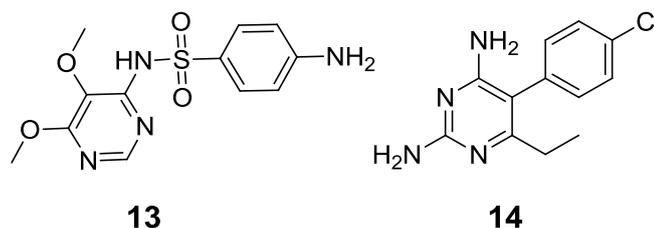


Figure 6. Fansidar®

1.1.2.3.2 Molécules antimalariques en développement

La fondation "Medicines for Malaria Venture" (MMV) a publié récemment (Figure 7) sur son site internet le portfolio antimalarique mondial au 1^{er} trimestre 2012.³² Comme on peut le constater, plus de 90 % des projets de découverte de molécules antimalariques ciblent la phase érythrocytaire du cycle du *P. falciparum*. Parmi ceux-ci, 38 sont en études clinique ou préclinique (Figure 8) avec une nette prédominance des ACT. Quatre ont reçu l'autorisation de mise sur le marché. Au regard du grand nombre de projets en développement, nous avons choisi de détailler ceux qui sont en rapport avec les produits naturels.

³¹ White, N. J. *N. Eng. J. Med.* **2006**, *355*, 1956-1957.

³² Medicines for Malaria Venture, Global Antimalarial Portfolio (<http://www.mmv.org/research-development/science-portfolio>), **2012**

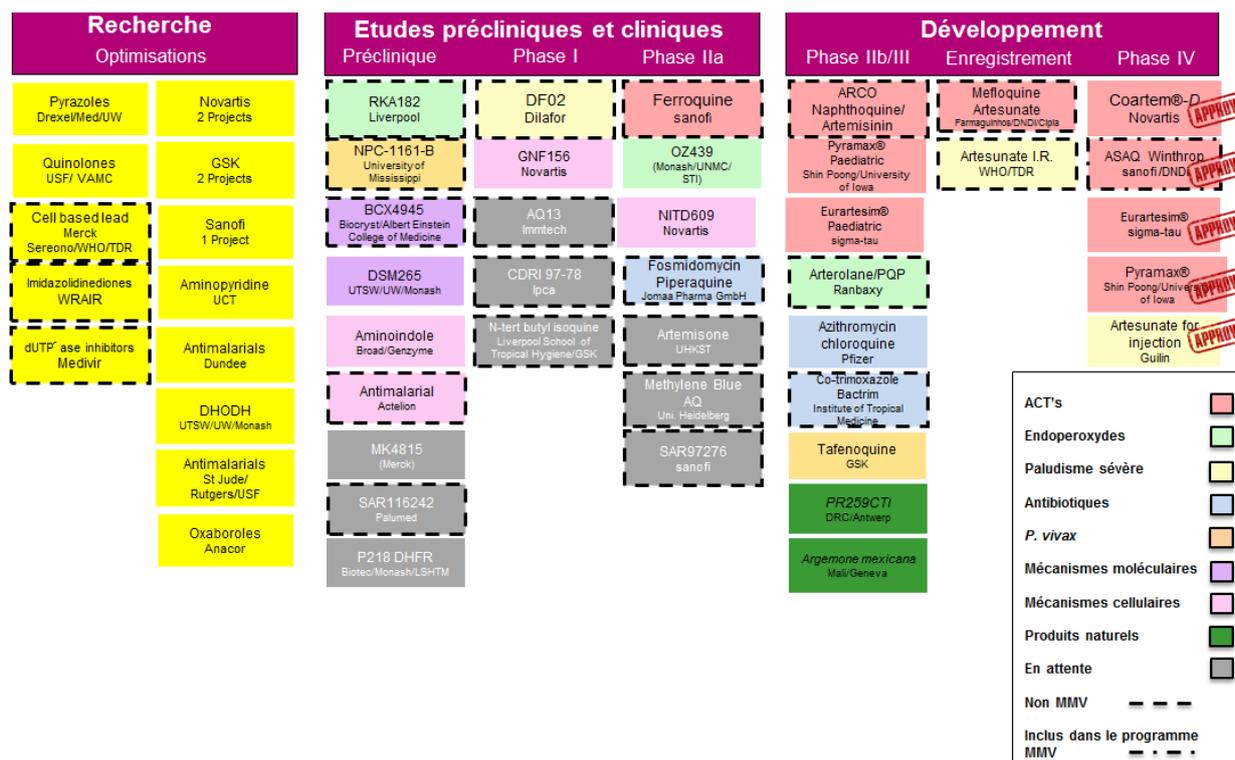


Figure 7. Schéma récapitulatif des projets antimalariques dans le monde (1^{er} trimestre 2012, MMV)

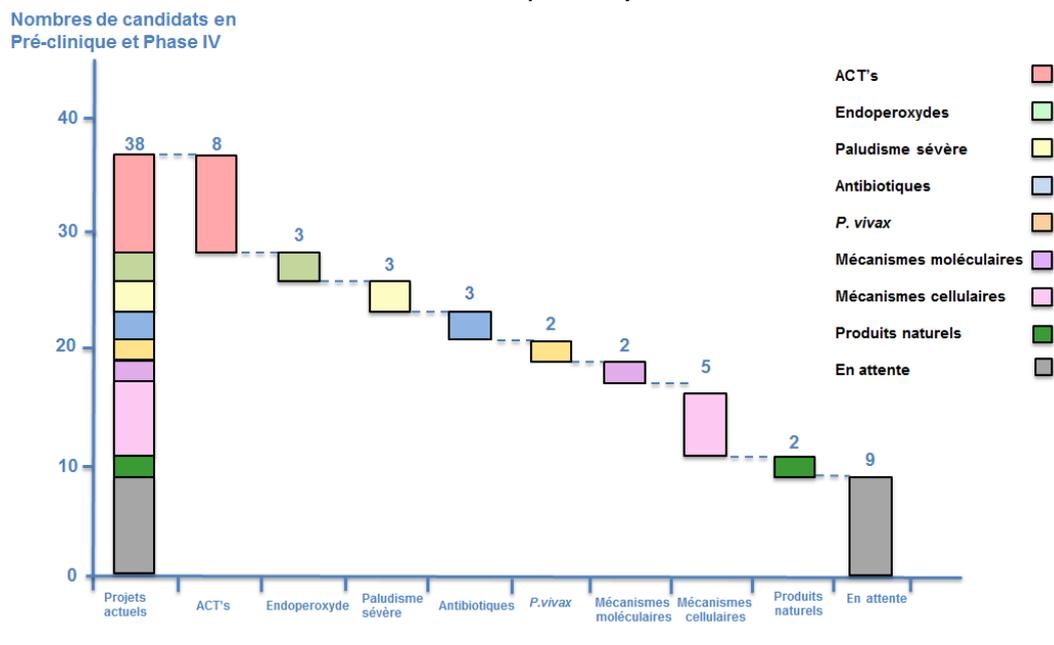


Figure 8. Schéma indiquant le nombre de candidats en phase préclinique et phase IV (MMV, 2012)

a- Les trioxaquinines : "SAR116242"

Les trioxaquinines (Figure 9) constituent un bel exemple de chimie bio-inspirée, développé par Bernard Meunier.³³ En effet, il eut l'idée d'associer par un lien covalent le motif aminoquinoléine (existant dans la chloroquine) à un trioxane (pharmacophore de l'artémisinine) afin d'améliorer la pharmacocinétique de ces deux pharmacophores et d'éviter l'apparition rapide de phénomènes de résistance. D'une part, la partie aminoquinoléine aura le rôle de vecteur, notamment grâce à sa capacité à se protoner ou se déprotoner lors des passages membranaires. D'autre part, elle aura la faculté de s'accumuler dans la vacuole digestive acide des plasmodiums, drainant ainsi la partie trioxane, vers l'intérieur des érythrocytes infectés, pour jouer son rôle d'alkylant.³⁴ Ces composés se sont montrés comme étant des agents antipaludiques efficaces sur tous les stades intraérythrocytaires du parasite.³⁵

Récemment, ces recherches ont conduit à la sélection d'un candidat médicament, le PA1103/SAR116242³⁶ (**15**), qui est en cours d'études précliniques.³⁷

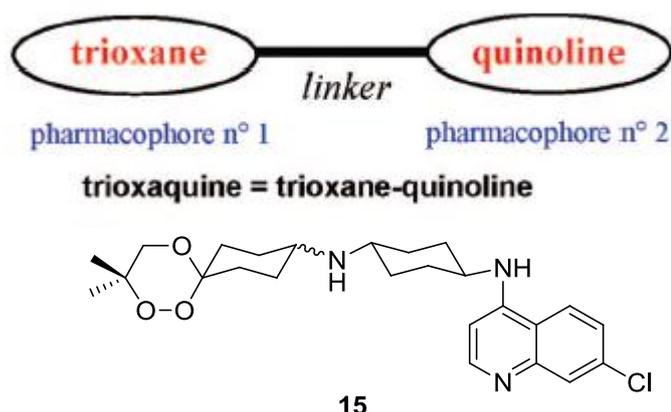


Figure 9. La stratégie molécules hybrides

b- Les ozonides : OZ439 et OZ277

Les ozonides "OZ277" (**16**) et "OZ439" (**17**) (Figure 10) sont des molécules de synthèse issues d'une collaboration entre University of Nebraska Medical Center, la fondation MMV, l'université de Monash et l'Institut Suisse de Santé Publique et Tropicale.

Ces deux composés possèdent, un motif 1,2,4-trioxolane essentiel à l'activité.³⁸

³³ Meunier, B. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *41*, 69-77.

³⁴ Meunier, B. *Cr. Chim.* **2011**, *14*, 400-405.

³⁵ Benoit-Vical, F. et al. *Antimicrob. Agents Chmother.* **2007**, *51*, 1463-1472.

³⁶ Cosledan, F. et al. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17579-17584.

³⁷ Olliaro, P. et al. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2009**, *85*, 584-595.

³⁸ Dong, Y. et al. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 481-491.

L'ozonide "OZ277"³⁹ (**16**), aussi connu sous le nom d'arterolane, est le premier ozonide de synthèse à être évalué en clinique. Il est actuellement en phase III en association avec le phosphate de piperazine.

Lors des essais de Phase I, son temps de demi-vie était à peine 3 à 4 fois supérieur à celui de la dihydroartémisinine. De plus, lorsqu'il est administré en monothérapie à des patients atteints du paludisme, sa biodisponibilité est réduite par rapport à celle des volontaires sains.

Dans le but d'améliorer le temps de demi-vie de ce premier candidat, notamment la stabilité de la liaison peroxyde, des modifications structurales ont été effectuées et ont conduit à la conception de l'ozonide, de seconde génération, "OZ439" (**17**).⁴⁰

L'ozonide "OZ439" (**17**), possède des propriétés pharmacocinétique et antipaludique exceptionnelles. En effet, lors de tests *in vivo* sur *Plasmodium berghei*, ce dernier a non seulement été curatif *per os* en une seule dose à 20 mg/kg, mais a également montré des propriétés préventives comparables à celles de la mefloquine. Il est actuellement en essai clinique de phase IIa.

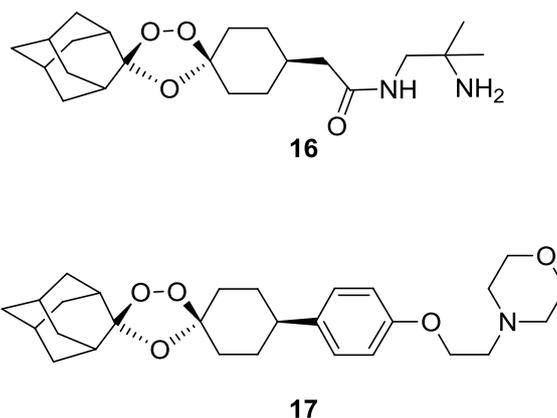


Figure 10. Structure des ozonides

c-Les spiroindolones "NITD 609"

A l'issue du criblage de la chimiothèque NOVARTIS de 12 000 produits sur le test cellulaire du *P. falciparum*, contenant des produits naturels et des produits de synthèse apparentés aux produits naturels, les composés comprenant le motif spiroindolone se sont vite démarqués du reste des produits⁴¹. Le "NITD 609" (**18**) (Figure 11), a été obtenu suite à un certain nombre d'optimisations chimiques du motif spiroindolone, initialement détecté lors du criblage. Ce composé possède une pharmacocinétique compatible avec la voie orale.

En 20 ans, le "NITD 609" est le premier candidat médicament antimalarique, possédant un nouveau mécanisme d'action, à entrer en phase IIa. En effet, ce dernier aurait la capacité

³⁹ Vennerstrom, J. L. et al. *Nature* **2004**, *430*, 900-904.

⁴⁰ Charman, S. A. et al. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4400-4405.

d'inhiber la synthèse protéique du parasite plus rapidement que l'artémisinine ou la mefloquine. En effet, des études génomiques suggèrent que le "NITD 609" agirait sur la PfATP4, un transporteur de cation ATP dépendant différent des transporteurs de ce type déjà connus (SERCA⁴² inhibé par l'artésunate). Néanmoins, les informations disponibles sur ce transporteur à l'heure actuelle, ne permettent pas d'élucider le mécanisme d'action du "NITD 609".⁴³

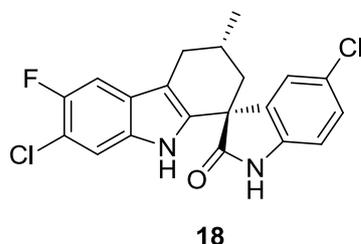


Figure 11. Structure du NITD 609

d- Les extraits naturels :

Parmi les produits ou molécules testés en phases clinique, deux projets concernent des extraits naturels : "PR259CT1" et *Argemone mexicana*.

Le "PR259CT1" est un remède traditionnel, actuellement en phase IIb, originaire de la République Démocratique du Congo (RDC), préparé à partir d'une décoction d'écorces de *Nauclea pobeguinii*, qui contient majoritairement de la strictosamide (**19**) (Figure 12).⁴⁴

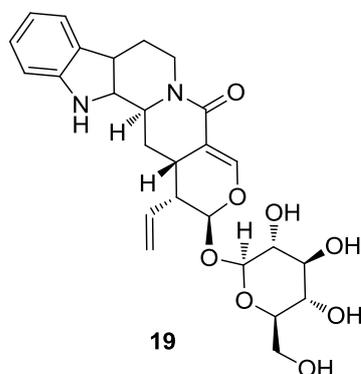


Figure 12. Structure de la strictosamide

Curieusement, l'extrait éthanolique est actif sur modèle murin mais n'a pas montré d'efficacité significative *in vitro*. De plus, l'administration de cet extrait par voie intra-péritonéale s'est montrée moins efficace que la voie orale, suggérant ainsi l'hypothèse que la strictosamide

⁴¹ Rottmann, M. et al. *Science* **2010**, *329*, 1175-1180.

⁴² Pompe responsable du transport des ions Calcium du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique

⁴³ Bruneel, F. *Med. Maladies Infect.* **2011**, *41*, 675-676.

⁴⁴ Mesia, K. et al. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *131*, 10-16.

(19) subirait une déglycosylation lors de son passage gastro-intestinal, indispensable à l'activité antipaludique.

Le second candidat, actuellement en phase IIb, est une décoction préparée à partir d'*Argemone mexicana* (Figure 13). Cette dernière contient 3 composés actifs : la protopine (20), l'allocryptopine (21) et la berberine (22) (Figure 14).

Une étude clinique randomisée récente,⁴⁵ a comparé l'effet de cette décoction au traitement classique à base d'artémisinine (artésunate-amodiaquine) recommandé par l'OMS. Elle a montré que la potion à base de feuilles pouvait être recommandée en raison de l'efficacité du traitement, comparable à celle de l'association médicamenteuse Artesunate-Amodiaquine, utilisée actuellement dans le traitement du paludisme.



Figure 13. Photo d'*Argemone mexicana*⁴⁵

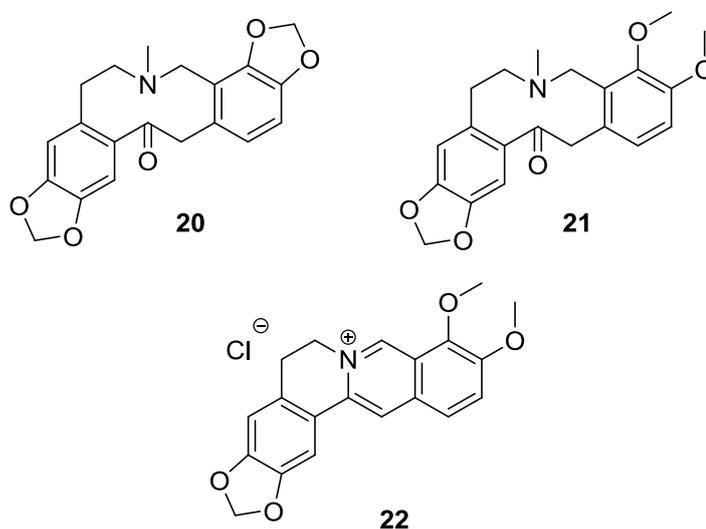


Figure 14. Structure des trois ingrédients actifs contenus dans *Argemone mexicana*

⁴⁵ Graz, B. et al. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *104*, 33-41.

1.2 La recherche actuelle de composés antipaludiques

Le taux de découverte de nouveaux agents antimalariques s'est fortement ralenti depuis les années 1980,⁴⁶ en raison de l'investissement réduit des principales industries pharmaceutiques dans ce domaine. Depuis la moitié des années 2000, la plupart des travaux sont orientés vers :

- Des modifications chimiques des pharmacophores préexistants dans le but de retarder des résistances et/ou d'améliorer leurs propriétés pharmacologiques.
- L'évaluation biologique de ces composés sur de nouvelles cibles proposées par les parasitologues.

1.2.1 État de la recherche antipaludique

La recherche antipaludique actuelle se trouve confrontée à une situation de crise qui peut s'expliquer par les raisons suivantes :

- L'absence de nouvelles classes d'antimalarique en clinique depuis 1996.⁴⁷
- L'émergence de résistances contre la dernière classe d'antimalarique efficace, les ACT.
- Pas de réelles découvertes de nouveaux candidats antimalariques, malgré les avancées de la génomique avec le séquençage complet du *P. falciparum*.⁴⁸
- Échec des campagnes de criblage sur des cibles parasitaires purifiées, comme cela a été le cas pour la recherche de nouveaux antibactériens.⁴⁹

De ce fait, il est indispensable de trouver des molécules agissant sur de nouvelles cibles biologiques, tout en prenant en compte les différents paramètres inhérents à la lutte contre le paludisme. Voici les différents critères que doit satisfaire un composé afin d'être sélectionné pour un développement préclinique.⁵⁰

- Il doit avoir montré une très forte activité antiplasmodiale (submicromolaire) sur des souches chloroquino-résistantes et chloroquino-sensibles du *P. falciparum*.
- Il doit posséder un indice de sélectivité (I.S. = CI_{50} cytotoxicité/ CI_{50} activité antiplasmodiale) élevé, de préférence > 1000

⁴⁶ Guiguemde, W. A. et al. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 116-129.

⁴⁷ Ekland, E. H. et al. *Int. J. Parasitol.* **2008**, *38*, 743-747.

⁴⁸ Gardner, M. J. et al. *Nature* **2002**, *419*, 498-511.

⁴⁹ Payne, D. J. et al. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, *6*, 29-40.

⁵⁰ Wright, C. W. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 961-968.

- Il devra conduire à une éradication de la parasitémie sur modèle murin sans montrer de toxicité.
- Il devra avoir une bonne biodisponibilité par voie orale
- Il devra être fabriqué avec un coût de production raisonnable

1.2.2 Les différentes approches conduisant à la découverte de nouveaux candidats antimalariques

1.2.2.1 Le criblage de chimiothèques

Différentes campagnes de criblages ont été effectuées ces dix dernières années, dans le but d'identifier de nouvelles classes d'antimalariques, que ce soit dans le milieu industriel ou académique. Ces campagnes ont basé leur recherche sur trois types de stratégies de criblages et ces stratégies sont :

1.2.2.1.1 Le criblage virtuel

Le nombre grandissant de cibles génomiques d'intérêt thérapeutique et de macromolécules pour lesquelles une structure tridimensionnelle (3-D) est disponible rend les techniques de criblage virtuel de plus en plus attractives pour des projets d'identification de candidats médicaments. En effet, le séquençage du génome du *P. falciparum*, qui a révélé que 60 % de ses protéines n'avaient pas d'équivalents chez l'homme, a permis la découverte d'un certain nombre de cibles protéiques essentielles au parasite sur lesquelles le criblage virtuel a été conduit. On peut citer:

La chaîne respiratoire mitochondriale du parasite : Une étude récente,⁵¹ décrit le criblage virtuel à haut débit d'une chimiothèque de 750 000 composés à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme mitochondriale NADH du parasite (quinone oxydoréductase, PfNdh2) (Figure 15), pour laquelle un seul inhibiteur de référence est connu, le 1-hydroxy-2-dodecyl-4-(1H) quinolone (**26**) (HDQ⁵²). En effet, la chaîne respiratoire parasitaire constitue une cible antipaludique privilégiée parce qu'elle diffère de celle de l'homme par l'absence de l'ubiquinone oxydoréductase (Complexe I). Finalement, cette étude a permis de mettre en évidence 48 inhibiteurs de l'enzyme, possédant des structures chimiques différentes (Figure 16) et présentant des CI₅₀ allant de 100 nM à 40 µM sur l'enzyme ainsi qu'une activité antiplasmodiale *in*

⁵¹ Sharma, R. et al. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3144-3154.

⁵² Reil, E. et al. *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, *1318*, 291-298.

cellulo (sur la souche 3D7) très intéressante. Ces résultats constituent des points de départ potentiels pour des programmes de chimie médicinale.

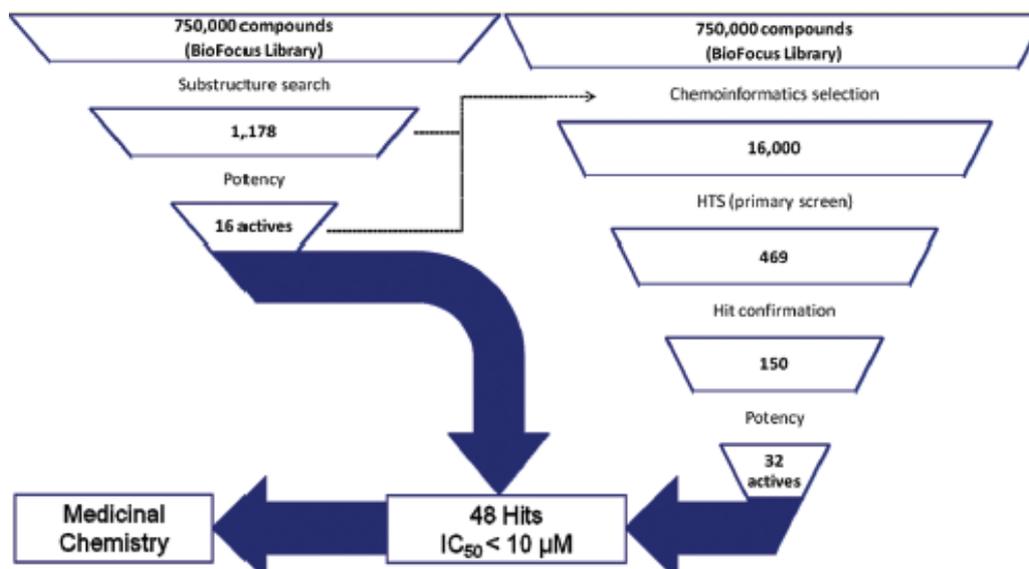


Figure 15. Criblage virtuel d'une chimiothèque pour identifier de nouveaux antimalariques⁵¹

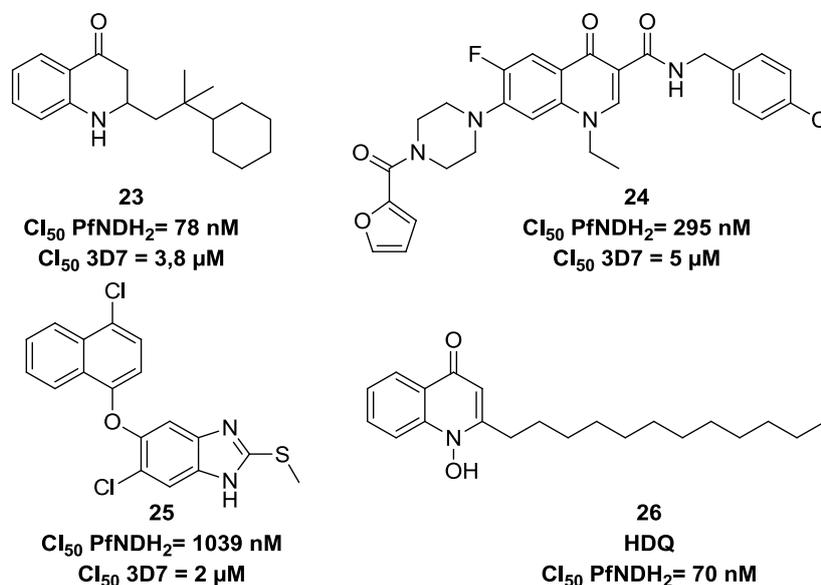


Figure 16. Structures de molécules inhibitrices de l'enzyme PfNDH2

Il faut noter que le criblage virtuel est handicapé par le faible nombre de cibles parasitaires validées pour la recherche d'antimalarique. En effet, des cibles comme **les cystéines protéases** : telles que les falcipains, font partie des protéines responsables du processus d'hydrolyse de

l'hémoglobine et d'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes.⁵³ De ce fait, des inhibiteurs de cystéines protéases seraient d'excellents agents antimalariques.⁵⁴ Cependant, pour l'instant aucun inhibiteur de cystéines protéases n'est en phase clinique.⁵⁵

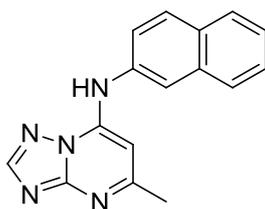
Le nombre limité d'études⁵⁶ basées sur le criblage virtuel, ayant conduit à la mise en évidence de candidats potentiels pour des études précliniques, rend difficile l'évaluation de ce type d'approche pour la découverte de nouveaux agents antimalariques.

1.2.2.1.2 Le criblage basé sur des cibles moléculaires

Le criblage sur des cibles moléculaires a dominé les efforts de découverte de médicaments ces dernières années. En effet, un certain nombre de criblage ont été effectués sur des enzymes parasitaires comme : la Lactate Déshydrogénase (LDH) et la Dihydroorotate Dehydrogenase (PfdHODH).

La recherche d'inhibiteurs de la LDH a été menée par plusieurs laboratoires, dont GlaxoSmithKline (GSK). Ce dernier a conduit une campagne de criblage de 500 000 composés aboutissant ainsi à l'identification de dérivés azolés.⁵⁷ Malgré des efforts d'optimisation pour augmenter leur activité, le projet fut abandonné en concluant que la LDH n'est pas une cible thérapeutique exploitable en termes de recherche d'antipaludiques.

GSK a récemment conduit une autre campagne de criblage⁵⁸ de 2 000 000 de composés sur la PfdHODH, enzyme mitochondriale qui permet la transformation du dihydroorotate en orotate assurant ainsi l'unique voie de biosynthèse plasmodiale des nucléotides.⁵⁹ Cette étude a permis d'identifier 5 nouvelles familles d'inhibiteurs. Ces dernières sont maintenues comme des alternatives possibles aux triazolopyrimidines (Figure 17), actuellement en développement préclinique.



27

Figure 17. Structure d'un triazolopyrimidine

⁵³ Rosenthal, P. J. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, 712, 30-48.

⁵⁴ Rosenthal, P. *Int. J. Parasitol.* **2004**, 34, 1489-1499.

⁵⁵ Ettari, R. et al. *Med. Res. Rev.* **2010**, 30, 136-167.

⁵⁶ Penna-Coutinho, J. et al. *PLoS One* **2011**, 6, e21237.

⁵⁷ Cameron, A. et al. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 31429-31439.

⁵⁸ Coteron, J. M. et al. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 5540-5561.

⁵⁹ Deng, X. et al. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 26999-27009.

Enfin, d'autres types de criblage comme celui basé sur la détection par spectrométrie de masse d'adduit covalent "hème-petite molécule", peuvent être mis au point sans toutefois préjuger de leur réel pertinence sur le plan thérapeutique. Cette technique, développée par l'équipe de Bruno Figadère,⁶⁰ s'inspire du mécanisme d'action de certaines molécules antimalariques comme l'artémisinine, agissant par alkylation de l'hème. Elle pourrait avoir une application intéressante dans l'analyse d'extraits bruts naturels, notamment en vue de leur "déréplication" à la recherche de composés antimalariques.

1.2.2.1.3 Le criblage cellulaire

Les leçons acquises, lors de la mise en œuvre des programmes de recherche portant sur les agents antibactériens et antifongiques, ont clairement prouvé qu'il était plus aisé de trouver une cible pour un composé détecté lors d'un criblage cellulaire, que d'optimiser un inhibiteur enzymatique pour augmenter sa perméabilité membranaire sans que ce dernier ne devienne cytotoxique. Par ailleurs, une étude récente⁶¹ a démontré que, sur la période 1999-2008 le criblage cellulaire a identifié davantage de molécules possédant un nouveau mécanisme d'action que toutes autres techniques de criblage. De ce fait, le criblage cellulaire reste une approche privilégiée dans la recherche de nouveaux médicaments antipaludiques

À la fin des années 2000, trois groupes, parmi lesquels, un du milieu académique : St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH)⁶² et deux, provenant du milieu industriel : GlaxoSmithKline (GSK)⁶³ et Novartis,⁶⁴ ont identifié de nouveaux candidats antimalariques à la suite de campagnes de criblage de leur chimiothèque sur le *P. falciparum in vitro*. Les structures des différents "candidats médicaments" trouvés ont été déposées dans des bases de données publiques.⁶⁵

A l'issue des différents criblages, chaque groupe a sélectionné un certain nombre de composés, considérés comme prioritaires, dans le but de démarrer des programmes de développement. Ces molécules prioritaires sont illustrées dans le Tableau I ci-dessous.

⁶⁰ Muñoz-Durango, K. et al. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3324-3329.

⁶¹ Swinney, D. C. et al. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2011**, *10*, 507-519.

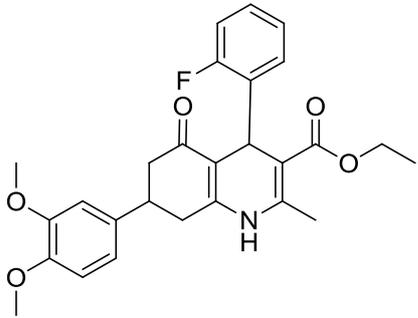
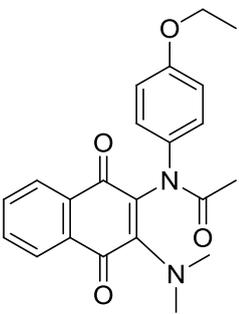
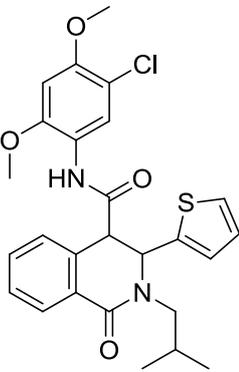
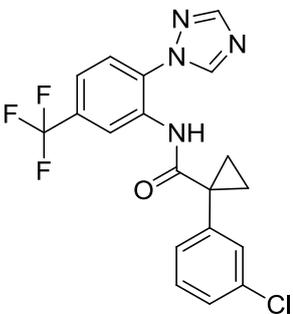
⁶² Guiguemde, W. A. et al. *Nature* **2010**, *465*, 311-315.

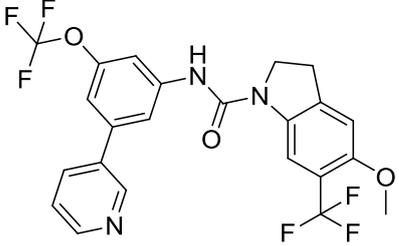
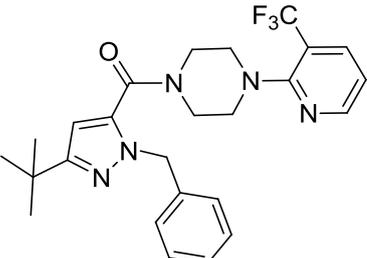
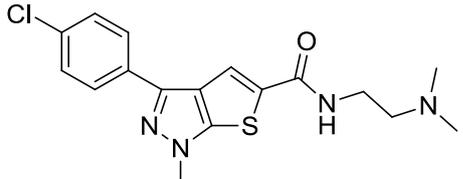
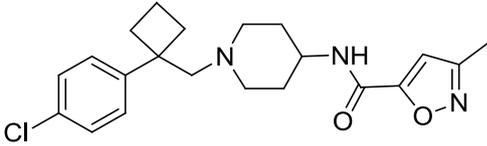
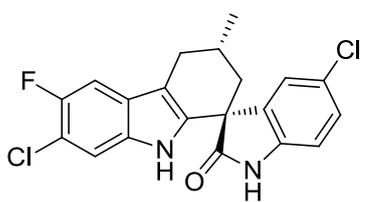
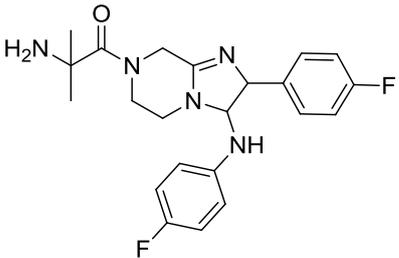
⁶³ Gamo, F.-J. et al. *Nature* **2010**, *465*, 305-310.

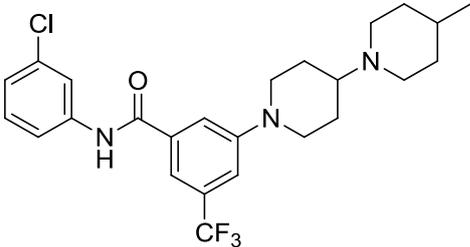
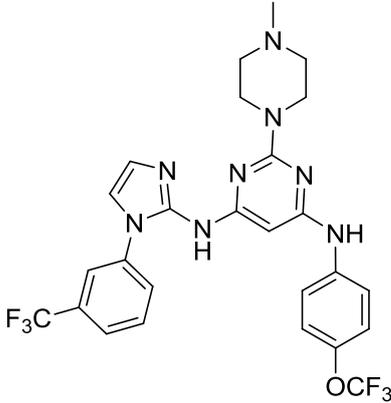
⁶⁴ Plouffe, D. et al. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9059-9064.

⁶⁵ <https://www.ebi.ac.uk/chemblntd/>

Tableau I. Structures des molécules prioritaires de chaque groupe

Molécule	Famille chimique	Groupe	État de développement
	Dihydropyridine	SJCRH	Optimisation
	Diaminonaphthoquinone	SJCRH	Optimisation
	Dihydroisoquinoléine	SJCRH	Préclinique
	Carboxamide	GSK	Optimisation

Molécule	Famille chimique	Groupe	État de développement
	Indoline	GSK	Optimisation
	Alkylpyrazole	GSK	Optimisation
	Thienopyrazole	GSK	Optimisation
	Aminopiperidine	GSK	Optimisation
	Spiroindolone	Novartis	Phase I
	Imidazolo piperazine	Novartis	Préclinique

Molécule	Famille chimique	Groupe	État de développement
	Benzamide	Novartis	Optimisation
	Pyrimidine-4,6-diamine	Novartis	Optimisation

Ces partenariats publics-privés, ont permis à la fondation MMV de proposer gratuitement à la communauté scientifique, une collection validée de 400 composés possédant une activité antiplasmodiale et disponible commercialement, appelée "Malaria box" (Figure 18). Cette dernière a pour but d'encourager la recherche d'agents antipaludiques et de faciliter l'initiation de programmes de chimie médicinale, afin d'optimiser ces composés.

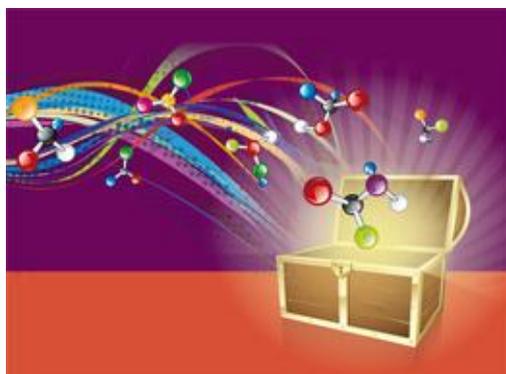


Figure 18. "Malaria box" (MMV)

1.2.2.2 Le criblage de médicaments connus

Les coûts élevés du développement de nouveaux médicaments freinent considérablement la découverte de nouveaux traitements pour bon nombre de maladies comme le paludisme. Dans le but d'accélérer cette découverte, un équipe de l'Université de Johns Hopkins a effectué le

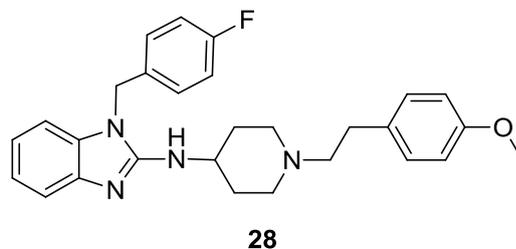


Figure 19. Structure de l'Astemizole

criblage⁶⁶ de plus de 2000 composés, initialement autorisés à être évalués en essai clinique de phase II, sur des souches chloroquino-résistantes du *P. falciparum*. Ces travaux ont abouti à la détection d'un composé connu, ayant une activité antimalarique très intéressante, l'Astemizole (**28**) (Figure 19).

De ce fait, on pourrait imaginer que ce type de stratégie puisse s'appliquer à toutes molécules ayant été autorisées à être évaluées sur l'homme lors d'essais cliniques mais se retrouvant mises de côté pour des raisons d'efficacité. Une seconde jeunesse serait ainsi donnée à des molécules abandonnées dans les placards de nombreuses industries pharmaceutiques.

⁶⁶ Chong, C. R. et al. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 415-416.

1.2.2.3 Le criblage d'extraits naturels

Les pharmacophores identifiés à partir des produits naturels constituent la base de la plupart des médicaments antipaludiques actuels. Néanmoins depuis la seconde moitié du XX^{ème} siècle, la mise en évidence de nouveaux pharmacophores antimalariques naturels se fait de plus en plus rare.⁶⁷ A titre d'exemple on peut citer, la Psammaplysin H⁶⁸ (**28**) (Figure 20) qui présente un nouveau châssis moléculaire antimalarique de type isoxazole spirocyclique.⁶⁹

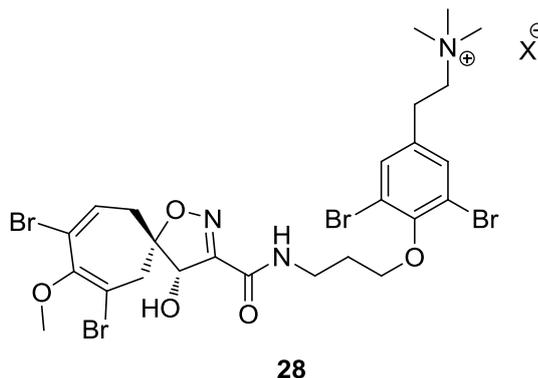


Figure 20. Structure du Psammaplysin H

Ce composé, isolé d'une éponge marine du genre *Pseudoceratina*, a montré une activité antiplasmodiale très intéressante (CI₅₀ = 410 nM) ainsi qu'un très bon indice de sélectivité vis-à-vis des lignées cellulaires HEK-293 et Hep G2 (IS > 97).

Lors de la recherche de composés à activité antiplasmodiale à partir de plantes, l'approche classique démarre par la validation des extraits, sélectionnés par un test *in cellulo* sur le *P. falciparum*, suivie d'un fractionnement bioguidé à la recherche des composés responsables de l'activité de l'extrait. Il arrive souvent que l'activité antiplasmodiale, ne se retrouve pas au niveau des molécules isolées et cela peut s'expliquer par le fait que les composés se soient dégradés pendant les étapes de purification ou alors que l'activité soit due à une synergie entre les composés.

En effet, Ginsburgh et Deharo⁷⁰ ont analysé attentivement 1031 articles de la littérature, en rapport avec la recherche de produits naturels à activité antiplasmodiale, et ils ont observé que les extraits bruts étaient souvent plus actifs que les produits purs isolés.

⁶⁷ Ginsburg, H. et al. *Malaria. J.* **2011**, *10*, S1.

⁶⁸ Xu, M. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 846-848.

⁶⁹ Marson, C. M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5514-5533.

⁷⁰ Deharo, E. et al. *Malaria. J.* **2011**, *10*, S5.

Suite à ces observations ainsi qu'au fait de la réduction du nombre de nouveaux pharmacophores issus de l'étude systématique d'extraits de plantes, certains chercheurs tendent à remplacer ce type d'approche par une méthodologie basée sur l'exploitation des savoirs de l'ethnopharmacologie par rapport aux espèces de plantes employées, pour lesquelles une efficacité chez l'homme aura été préalablement observée et validée. Cette approche, consistant à confirmer une activité observée chez l'homme, s'inspire d'une méthodologie proposée il y a plus de 60 ans par le docteur chinois Chen Guofu,⁷¹ appelée : "*dao-xing-ni-shi*" qui veut dire : agir dans le sens inverse.

Cette méthodologie a été longuement contestée d'un point de vue éthique car elle tend à utiliser des êtres humains comme cobaye. Aujourd'hui, les autorités de santé comme l'European Medicines Agency (EMA), l'US-FDA et l'Organisation mondiale de la santé ont autorisé l'utilisation des plantes médicinales par les patients souffrant du paludisme, et encouragent ces communautés à produire des procédures standardisées par rapport à la préparation, l'usage et la sécurité de ces plantes.

Cette approche mêlant ethnopharmacologie et validation de l'efficacité de l'extrait brut chez l'homme comprend 4 étapes :

- **1^{ère} étape : Observations cliniques :**

Cette étape définit l'activité de l'extrait sur les patients, en contrôlant leurs parasitémie, température, durée de réponse, âge et statut immunitaire. Elle permet également d'obtenir et d'analyser des échantillons de plasma afin de confirmer leurs activités sur le parasite *ex vivo*.

- **2^{ème} étape : Essais pharmacologiques *in vivo* :**

Cette étape définit l'activité de l'extrait sur des modèles murins afin de :

- Confirmer si les métabolites observés chez l'homme, sont différents de ceux présents chez le modèle murin
- Obtenir des échantillons de plasma et de les analyser.

- **3^{ème} étape : Essai pharmacologique *in vitro* :**

Cette étape consiste à tester les extraits sur le *P. falciparum in vitro* afin de confirmer l'activité observée aux doses employées chez l'homme et la souris.

- **4^{ème} étape : Fractionnement :**

Cette étape permet de confirmer que l'activité initiale de l'extrait est toujours présente dans les fractions.

⁷¹ Lei, S. H.-l. *Soc. Stud. Sci.* **1999**, 29, 323-358.

Ce changement d'approche nécessiterait un certain nombre d'efforts en matière de standardisation des observations cliniques ainsi que des modes d'évaluation de l'activité antiplasmodiale à partir d'isolats de patients.

Enfin, comme cette approche ne remplit pas le cahier des charges de certaines fondations comme la MMV, elle ne peut donc pas bénéficier d'aides financières. En revanche, l'ANDi⁷² (le Réseau Africain pour l'innovation dans les médicaments et les diagnostics) peut jouer un rôle majeur dans le développement de cette approche et cela en participant à la standardisation des protocoles cliniques, afin de mieux comprendre l'usage des plantes médicinales locales.

⁷² Mboya-Okeyo, T. et al. *The Lancet* **2009**, *373*, 1507-1508.

2-Présentation du projet

2.1 Environnement du projet

Comme il a été évoqué au chapitre précédent, depuis la découverte de l'artémisinine, peu de substances naturelles sont venues s'ajouter à l'arsenal thérapeutique antimalarique. Or les problèmes de résistance du plasmodium aux différents traitements préventifs et/ou curatifs constituent aujourd'hui une menace importante pour les populations vivant en zones d'endémie et les voyageurs se rendant dans les pays de la zone intertropicale.

C'est dans ce contexte que notre équipe s'est penchée depuis environ 6 ans sur la recherche et la caractérisation de nouveaux agents antimalariques. Ce projet effectué en collaboration avec l'équipe du Professeur Philippe Grellier (Museum National d'Histoire Naturelle) a débuté par la mise en place d'un criblage systématique sur une souche résistante du *Plasmodium falciparum* (FcB1) sur des extraits préparés à partir de différentes parties de plantes récoltées par nos partenaires. Le criblage a permis de sélectionner un petit nombre d'espèces d'origine diverse dont les études phytochimiques ont déjà conduit à la caractérisation de flavones prénylées⁷³ et de benzoylphloroglucinols polyprénylés,⁷⁴ possédant d'intéressantes propriétés biologiques.

2.2. L'essai biologique

L'essai biologique employé pour ce projet est basé sur l'incorporation de précurseurs radiomarqués comme l'hypoxanthine tritiée [³H] par le parasite suivant la méthode établie par Desjardin.⁷⁵ Les hématies humaines étant anucléées, cette incorporation est le reflet de l'activité antiplasmodiale des molécules testées. Le protocole détaillé de l'essai biologique est décrit dans la partie expérimentale.

2.3 Résultats préliminaires

Au total 4500 extraits provenant de la biodiversité vietnamienne, ougandaise, malgache, malaisienne et calédonienne ont été testés sur la souche *P. falciparum* FcB1 aux doses de 10, 5 et 1 µg/mL.

⁷³ Bourjot, M. et al. *Planta. Med.* **2010**, *76*, 1600,1604.

⁷⁴ Marti, G. et al. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 75-85.

⁷⁵ Desjardins, R. E. et al. *Antimicrob. Agents Chmother.* **1979**, *16*, 710-718.

Les résultats de ce criblage préliminaire ont montré que 52 extraits possédaient une activité biologique prometteuse (Inhibition de la croissance du plasmodium > à 80 % à 5 µg/mL).

Une première sélection des espèces actives et non corrélée à une forte cytotoxicité (sur lignées cellulaires cancéreuses et saines, KB et MRC5, respectivement) a conduit à ne retenir que 20 extraits. Ceux-ci ont été fractionnés par CLHP selon un protocole standard établi par le laboratoire, permettant de confirmer l'activité biologique initialement détectée.

Compte tenu des données de la littérature qui nous ont permis d'écartier à peu près la moitié des plantes présélectionnées, 11 plantes ont été retenues pour ce projet :

- *Calanthe balansae* (Orchidaceae de Nouvelle-Calédonie)
- *Pyrostria major* (Rubiaceae de Madagascar)
- *Pachypodium rosulatum* (Apocynaceae de Madagascar)
- *Lovanofia madagascariensis* (Leguminosae de Madagascar)
- *Gonioma malagasy* (Apocynaceae de Madagascar)
- *Mischocarpus fuscescens* (Sapindaceae du Vietnam)
- *Artocarpus styracifolius* (Moraceae du Vietnam)
- *Dasylepis eggelingii* (Flacourtiaceae d'Ouganda)
- *Myrianthus holstii* (Cecropiaceae d'Ouganda)
- *Markhamia platycalyx* (Bigoniaceae d'Ouganda)
- *Citropsis articulata* (Rutaceae d'Ouganda)

2.4 Plantes sélectionnées pour l'étude

Parmi les 11 plantes retenues pour le projet, certaines d'entre elles ont été confiées à nos collaborateurs, tandis que d'autres ont été étudiées au cours de thèses.⁷⁶

Au final, nous avons choisi d'étudier 2 espèces :

- *Pyrostria major* (Rubiaceae de Madagascar)
- *Gonioma malagasy* (Apocynaceae de Madagascar)

⁷⁶ Lacroix, D. et al. *Phytochemistry* **2009**, 70, 1239-1245.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour objectif principal de découvrir et caractériser, à partir de plantes issues de la biodiversité tropicale, de nouveaux composés antiplasmodiaux.

Les criblages préliminaires sur la souche FcB1 ainsi que sur KB et MRC5, ont permis de sélectionner 11 espèces. Parmi elles, nous avons choisi d'étudier l'espèce *Pyrostria major* (Rubiaceae) et l'espèce *Gonioma malagasy* (Apocynaceae). Leurs extraits AcOEt et alcaloïdique ont montré une des meilleures activités antiplasmodiales (99 % à 10 µg/mL). Bien qu'ayant déjà fait l'objet de 3 publications, l'espèce *Gonioma malagasy* a également été sélectionnée pour des critères structuraux intéressants, compte tenu des composés qui ont déjà été isolés à partir de cette plante.

Ces deux plantes ont donc été sélectionnées dans le but d'isoler de nouveaux agents possédant une activité antiplasmodiale, d'établir leur structure et de caractériser leurs propriétés biologiques.

Deuxième partie
II–*Pyrostria major*: Études chimique
et biologique

1-Étude bibliographique

1.1 La famille des Rubiaceae

1.1.1 Classification des Rubiaceae

Les Rubiaceae appartiennent à l'ordre des Gentianales qui renferme 5 familles : Les Apocynaceae, les Gelsemiaceae, les Gentianaceae, les Loganiaceae et les Rubiaceae. La phylogénie de cette famille a récemment été remaniée. En effet, la dernière classification APG (Angiosperms Phylogeny Groups) a reclassé cette grande famille tropicale dans l'ordre des Gentianales.⁷⁷ L'ordre est habituellement considéré comme faisant partie du complexe des Lamiales (Voir Annexe 1).

La famille des Rubiaceae est l'une des plus grandes familles de plantes,⁷⁸ avec plus de 13 000 espèces, réparties dans 620 genres. Ils sont morphologiquement très différents, on y retrouve des plantes herbacées annuelles comme les *Limnosipanea* et certains grands arbres de la canopée comme *Chimarrhis*. Et pourtant, la plupart du temps, ils peuvent être reconnus très facilement par la présence d'un ovaire inférieur, de feuilles opposées, munies de stipules foliacées se confondant avec les feuilles réelles.

1.1.2 Répartition géographique

La plupart des individus de la famille des Rubiaceae se trouvent dans les régions tropicales et subtropicales. On les retrouve exceptionnellement dans les zones de climat tempéré (Figure 21).⁷⁹

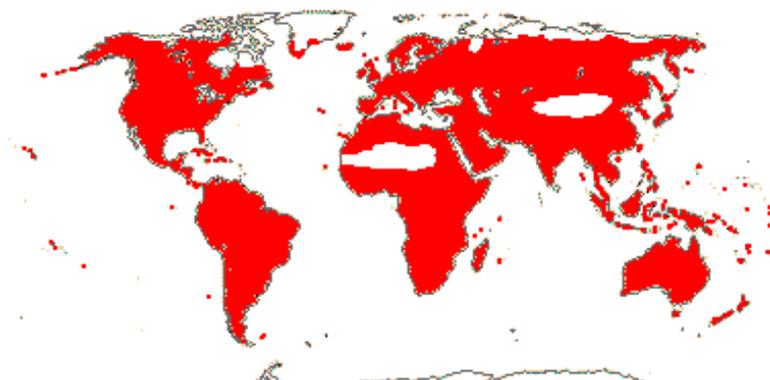


Figure 21. Répartition géographique des Rubiaceae

⁷⁷ APG. *Bot. J. Linn. Soc.* **2009**, *161*, 105-121.

⁷⁸ Bremer, B. et al. *Int. J. Plant. Sci.* **2009**, *170*, 766-793.

⁷⁹ <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/gentianalesweb.htm>, **27/04/2012**

1.1.3 Intérêt économique et utilisations traditionnelles

D'un point de vue économique, il faut souligner le rôle très important de deux espèces : *Coffea robusta* et *Coffea arabica*, avec lesquelles, le café est préparé par infusion de leurs graines. Sans oublier, la quinine, première molécule antimalarique, extraite à partir des écorces de différentes espèces de *Cinchona* et l'ipéca, un vomitif, produit par *Psychotria ipecacuanha*. Par ailleurs on retrouve des espèces ornementales dans les genres *Gardenia*, *Hamelia*, *Pentas*, *Randia*, *Rondeletia* et *Ixora*.

En médecine traditionnelle sub-saharienne, on retrouve un certain nombre d'espèces de Rubiaceae utilisées pour traiter plus de 70 indications médicales telles que : paludisme, hépatite, eczéma, œdème, hypertension et diabète.⁸⁰

Par ailleurs, le genre *Uncaria*, est souvent employé en médecine traditionnelle pour le traitement des ulcères, des fièvres, des maux de têtes et des cas d'infections fongiques.⁸¹

1.2 Le genre *Pyrostria* et l'espèce *Pyrostria major*

1.2.1 Description botanique

1.2.1.1 Le genre *Pyrostria*⁸²

Ce sont des arbustes, à fleurs complètes, monopétalées, à feuilles entières, opposées, dont les fleurs sont axillaires, pédonculées, à stipules très-caduques.

Les caractères essentiels de ce genre sont :

- Un calice supérieur, très petit, à quatre dents.
- Une corolle presque campanulée, à demi divisée, en cinq découpures.
- Une baie sèche, à cotés et à huit loges.

⁸⁰ Simplicie D. Karou et al. *Pak. J. Biol. Sci.* **2011**, *14*, 149-169.

⁸¹ Heitzman, M. E. et al. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 5-29.

⁸² Lamarck, J.-B. d. M. d. dans: *Encyclopédie méthodique*, **1804**, 744.

1.2.1.2 L'espèce *Pyrostria major* (A. Rich. ex DC.) Cavaco⁸³



Figure 22. Photos de *Pyrostria major*-Photos IMRA®

Pyrostria major, anciennement appelée *Canthium majus*,⁸⁴ est un arbuste de 4 m de haut, caractérisé par des feuilles à faces inférieures jaunes, et par la présence de boutons floraux, axillaires à l'aisselle de deux feuilles opposées. On peut aussi noter la présence de fruits en drupe (Figure 22).⁸⁵

1.2.2 Répartition géographique

Le genre *Pyrostria* est un genre pantropical, d'environ 80 espèces dont 63 à Madagascar, 14 sur le continent africain et 8 aux Mascareignes.⁸⁴

Pyrostria major Cavaco est endémique de Madagascar, notamment, au niveau des forêts humides qui longent la côte Est du pays. (Figure 23)



Figure 23. Répartition de *Pyrostria major*⁸⁶

⁸³ Cavaco, A. J. L. *Adansonia* 1967, 7, 357-361.

⁸⁴ Razafimandimbison, S. G. et al. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 2009, 96, 161-181.

⁸⁵ <http://www.tropicos.org/Name/27906943>, 29/04/2012

⁸⁶ http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map&kind=Pyrostria, 30/04/2012

1.2.3 Utilisations traditionnelles

Les Massai de la vallée Sekenani, emploient certaines espèces comme *Pyrostria phyllanthoidea*, pour sécuriser les clôtures de leurs huttes et confectionner des lances, des épées, et des bâtons. Aujourd'hui même si cette tribu s'est sédentarisée et qu'elle a besoin de moins d'armes pour se défendre, le port d'arme n'en demeure pas moins gravé dans sa culture. En effet, chaque type d'arme représente à un statut bien précis au sein de la tribu.⁸⁷

En médecine traditionnelle, les écorces de *Pyrostria phyllanthoidea* sont utilisées comme remède antimalarique par la tribu Pokot du Kenya.⁸⁸

En revanche, il n'y a pas d'utilisation traditionnelle connue à ce jour pour l'espèce *Pyrostria major*.⁸⁹

1.3 Composition chimique du genre *Pyrostria*

Le genre *Pyrostria* n'a fait jusqu'à présent l'objet d'aucune étude phytochimique. En raison de la mise en évidence d'une série de composés appartenant à la famille des diarylheptanoïdes à l'issue de l'étude phytochimique effectuée sur cette espèce, nous proposons d'en donner une vue d'ensemble en précisant leur classification (selon Cleason⁹⁰), leur distribution taxonomique et leurs activités biologiques.

1.3.1 Les Diarylheptanoïdes

Les diarylheptanoïdes constituent une classe de métabolites secondaires, caractérisée par le motif structural aryl-C₇-aryl. Ils peuvent être cycliques ou linéaires, c'est pourquoi ils ont été répartis en 5 types,⁹⁰ en fonction de leur structure chimique. Les diarylheptanoïdes de type 1 et 2 possèdent une structure linéaire, ils ont été séparés en deux pour des raisons pratiques. En revanche, les diarylheptanoïdes de type 3 et 4, se présentent sous une forme cyclisée au niveau des deux cycles aromatiques soit par une liaison C-C ou par une liaison éther, respectivement. Enfin le type 5, concerne les composés possédant une cyclisation de la chaîne heptanoïque.

⁸⁷ Bussmann, R. et al. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2006**, *2*, 22.

⁸⁸ Gakunju, D. M. et al. *Antimicrob. Agents Chmothber.* **1995**, *39*, 2606-2609.

⁸⁹ Communication personnelle Philippe Rasoanaivo.

⁹⁰ Per, C. et al. dans: *Occurrence, structure and bioactivity of 1,7-diarylheptanoids*, **2002**, 881-908

1.3.1.1 Type 1 : Diarylheptanoïdes linéaires non phénoliques

Parfois appelés diphénylheptanoïdes, ces composés restent bien confinés chez les Betulaceae, les Zingiberaceae et les Dioscoraceae.

Parmi les composés appartenant à ce type, on peut citer : la diospongine C (**29**) (Figure 24), isolé du rhizome de *Dioscorea spongiosa*. Ce composé a montré une activité antiostéoporotique significative.⁹¹ On peut citer aussi, l'officinaruminane A (**30**) (Figure 24), isolé du rhizome d'*Alpinia officinarum*. Il s'agit du premier exemple d'alcaloïde constitué de deux diarylheptanoïdes reliés par une pyridine.⁹² Par ailleurs on peut citer, la katsumadaine A (**31**) (Figure 24), isolée des graines d'*Alpinia katsumadai*. Ce composé a montré une activité antiémétique très intéressante. De plus, il s'agit du premier exemple de diarylheptanoïde à être lié à une unité α -pyrone.⁹³

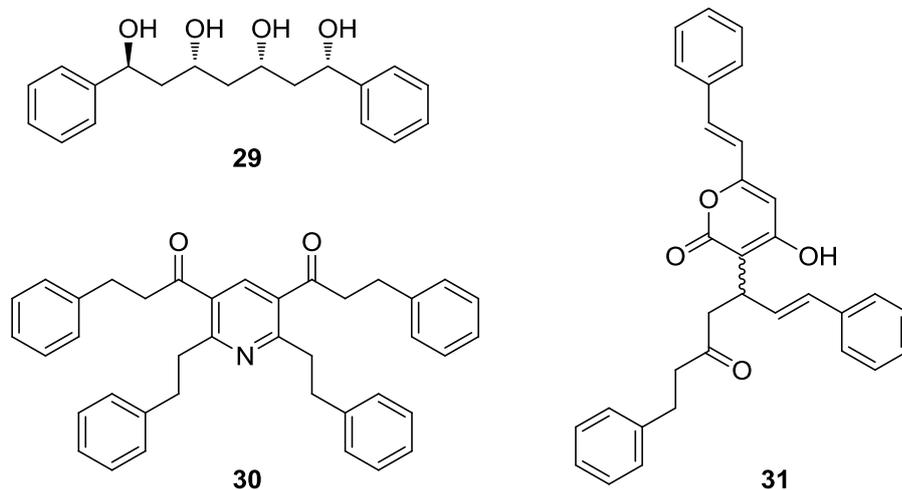


Figure 24. Structures de diarylheptanoïdes du type 1

1.3.1.2 Type 2 : Diarylheptanoïdes linéaires phénoliques

Il s'agit du type le plus riche avec plus de 60 molécules décrites dans la littérature. Ils ont longtemps été appelés : curcuminoïdes, en référence à la curcumine (**32**) (Figure 25)

La curcumine (**32**), un colorant jaune obtenu à partir de *Curcuma tinctoria* ainsi que d'autres espèces de *Curcuma*, a été isolé en 1815 par Vogel et Pelletier. Sa structure a été élucidée en 1910

⁹¹ Yin, J. et al. *Planta. Med.* **2004**, *70*, 54-58.

⁹² An, N. et al. *Food. Chem.* **2010**, *119*, 513-517.

⁹³ Yang, Y. et al. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1672-1674.

par Milobedzka et Lampe.⁹⁴ Enfin, il faut noter que la curcumine est le premier diarylheptanoïde à avoir été découvert.⁹⁵

La grande majorité des diarylheptanoïdes de ce type, a été isolée à partir de plantes de la famille des Betulaceae ainsi que des Zingiberaceae, mais ces dernières années un certain nombre

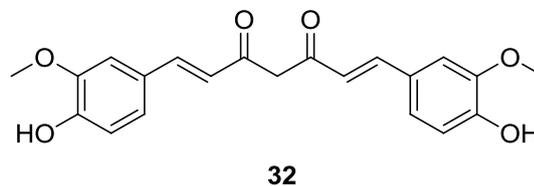


Figure 25. Structure de la curcumine

de composés ont été isolés pour la première fois à partir de familles n'étant pas connues pour produire des diarylheptanoïdes, comme les Pinaceae, les Rhoipteleaceae, les Viscaceae ou les Taccaceae.

Pour des raisons de clarté, nous nous sommes permis de répartir les diarylheptanoïdes du type 2 en deux sous-catégories, que voici :

1.3.1.2.1. Diarylheptanoïdes monomères

Parmi les diarylheptanoïdes monomères du type 2 (Figure 26), on peut citer :

- L'hirsutanone (**33**), premier diarylheptanoïde isolé à partir d'une plante de la famille des Viscaceae, *Viscum cruciatum*. Ce composé s'est montré cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses MCF-7, UACC-62 et TK-10.⁹⁶
- Le (-)-centrolol (**34**), isolée de *Centrolobium robustum*,⁹⁷ dont la stéréochimie a été révisée par Suga,⁹⁸ s'est montré très actif sur la forme promastigote de *Leishmania amazonensis*.⁹⁹
- La letestuianine C (**35**), isolée d'*Aframomum letestuianum*, a présenté une activité antitrypanosomale significative.¹⁰⁰
- L'acide shogasulfonique A (**36**), isolé du Shokyo (appellation japonaise du gingembre). Ce composé est considéré comme un artefact, parce qu'il résulterait des traitements subis par les rhizomes de gingembre pour obtenir le Shokyo,

⁹⁴ Milobędzka, J. et al. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1910**, *43*, 2163-2170.

⁹⁵ Keserü, G. M. et al. dans: *The chemistry of natural diarylheptanoids*, **1995**, 357-394

⁹⁶ Martín-Cordero, C. et al. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 567-569.

⁹⁷ Aragão Craveiro, A. et al. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 1869-1875.

⁹⁸ Ohta, S. et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 2423-2424.

⁹⁹ Araujo, C. A. C. et al. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 751-754.

¹⁰⁰ Kamnaing, P. et al. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 364-367.

remède issu de l'adaptation japonaise de la médecine traditionnelle chinoise, « le Kampo ». ¹⁰¹

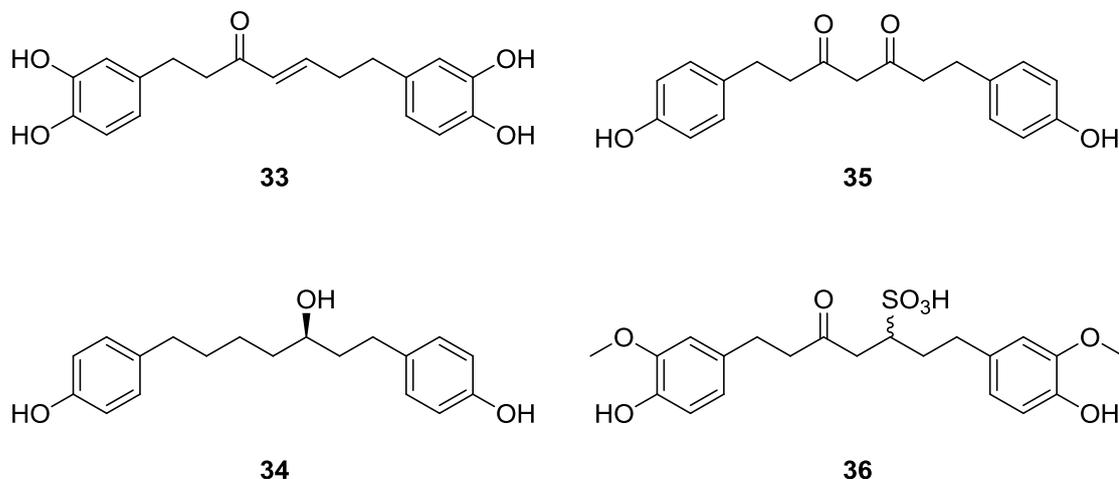


Figure 26. Exemples de structures de diarylheptanoïdes de type 2 monomères

1.3.1.2.2 Diarylheptanoïdes dimères

Parmi les diarylheptanoïdes homodimères on peut citer l'alpinoïde A (**37**)¹⁰² (Figure 27), isolé du rhizome d'*Alpinia officinarum*. Il s'agit du premier exemple de diarylheptanoïde dimère possédant deux unités arylheptanoïdes reliées par une liaison C-C.

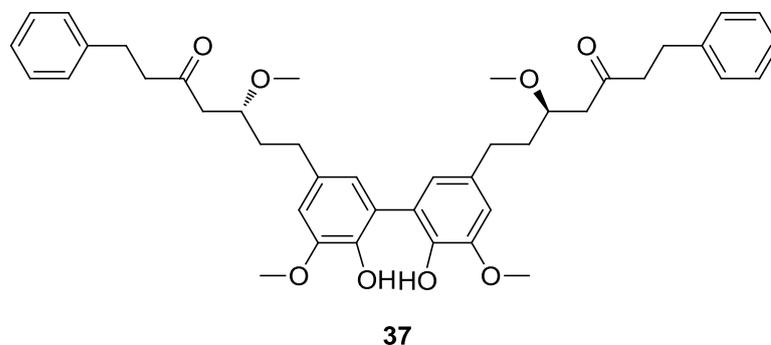


Figure 27. Structure de l'alpinoïde A

1.3.1.2.3 Diarylheptanoïdes hybrides

Dans certains cas, les diarylheptanoïdes peuvent être liés à d'autre classe de métabolites secondaires (Figure 28). Parmi les composés de cette catégorie :

¹⁰¹ Hori, Y. et al. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 613-617.

¹⁰² Sun, Y. et al. *Helv. Chim. acta.* **2008**, *91*, 118-123.

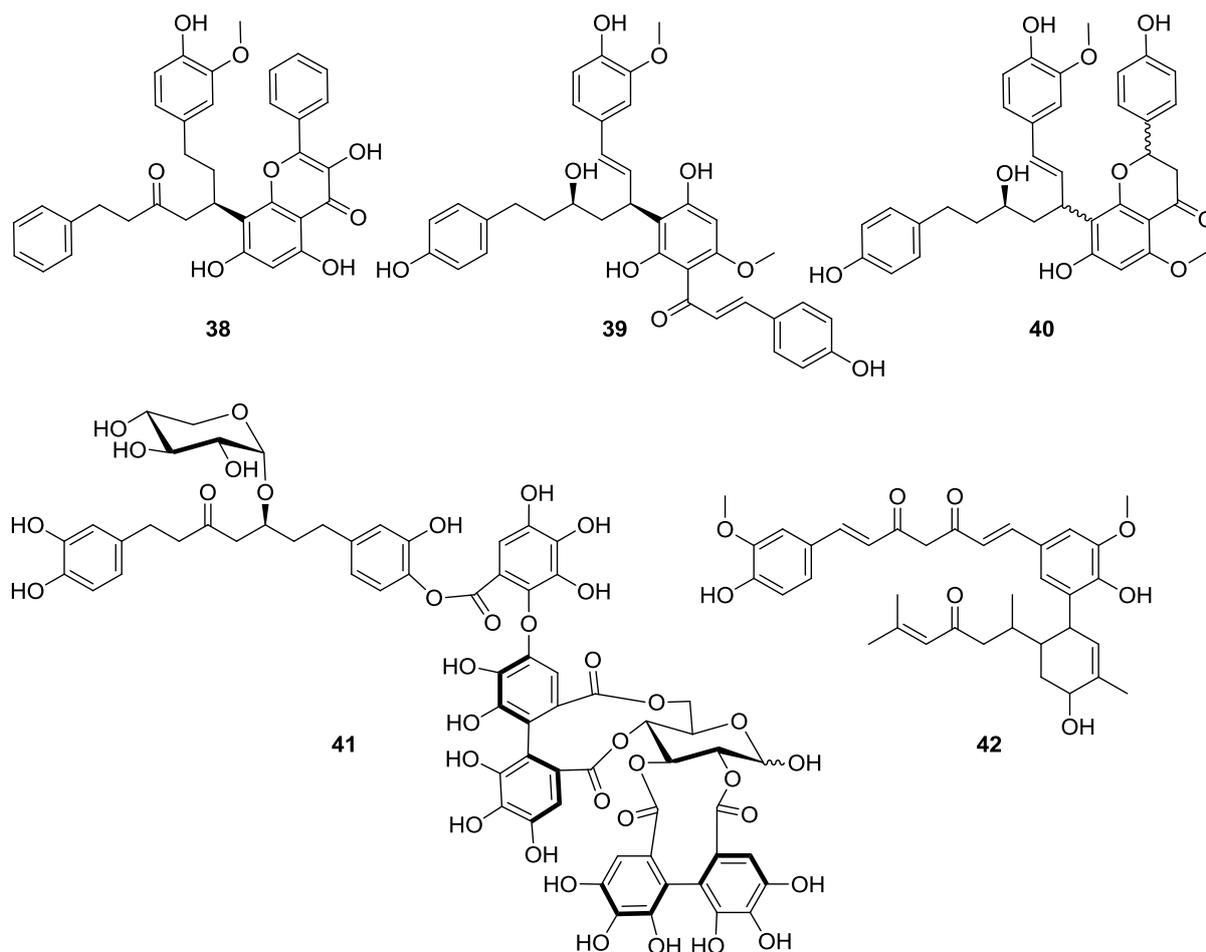


Figure 28. Structures de diarylheptanoïdes hétérodimères

- L'officinine A (**38**) a été isolée du rhizome d'*Alpinia officinarum*. Ce composé représente le premier exemple de diarylheptanoïde lié à une unité flavonol.¹⁰³
- La deoxycalyxine A (**39**) et la calyxine E (**40**) sont constituées d'une unité chalcone et d'une unité flavanone, respectivement. Ces deux composés ont été isolés des graines d'*Alpinia blepharocalyx*. Ils se sont montrés faiblement cytotoxiques sur les lignées cellulaires 26-L5 et HT1080.¹⁰⁴
- L'hirsunine (**41**) est un ellagitanin isolé d'*Alnus Hirsuta*.¹⁰⁵
- La bisabocurcumine (**42**) est un diarylheptanoïde greffé à une unité sesquiterpénique de type bisabolane. Ce composé a été isolé du rhizome de *Curcuma longa* L.¹⁰⁶

¹⁰³ Zhao, L. et al. *Chinese. Chem. Lett.* **2010**, *21*, 194-196.

¹⁰⁴ Tezuka, Y. et al. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 208-213.

¹⁰⁵ Min-Won, L. et al. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 967-970.

1.3.1.3 Type 3 : Diarylheptanoïdes macrocycliques

Ces composés (Figure 29) ont été décrits pour la première fois chez les Betulaceae, les Aceraceae et les Myricaceae.⁹⁰ Dans certains cas, on voit l'apparition de ce type de produit chez des familles apparentées. A titre d'exemple, le rhoiptelol A (**43**) isolé de *Rhoiptelea chilinatha* (Rhoipteleaceae).¹⁰⁷

Par ailleurs, il faut noter que ce type de composé a déjà été retrouvé chez des organismes marins. C'est le cas du cymodienol (**44**) isolé de la plante marine, *Cymodocea nodosa*. Ce composé s'est révélé faiblement cytotoxique sur les lignées cellulaires cancéreuses NSCLC-N6 et A-549.

Enfin, on peut citer la découverte récente du (+)-aR, 11*S* myricanol (**45**), isolé de *Myrica cerifera*. Au vu de son potentiel d'inhiber le mécanisme d'agrégation de la protéine Tau, ce composé pourrait être un châssis moléculaire intéressant pour le développement de médicament contre la maladie d'Alzheimer.¹⁰⁸

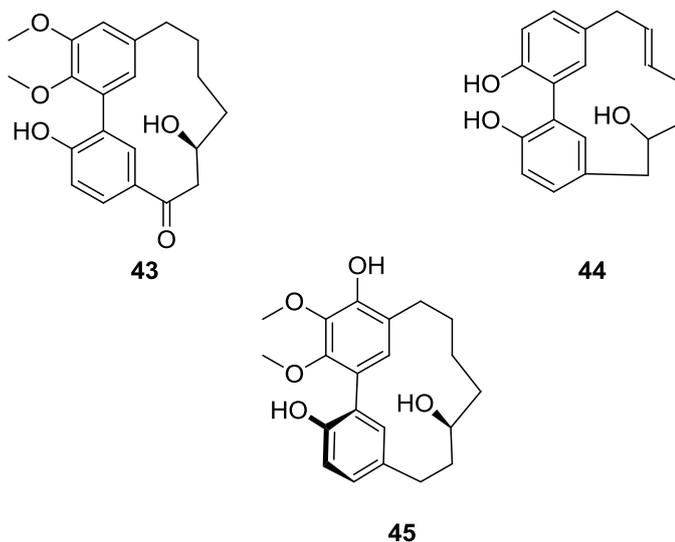


Figure 29. Structures de diarylheptanoïdes du type 3

1.3.1.4 Type 4 : Diaryletherheptanoïdes macrocycliques

La majorité de ces composés est retrouvée chez *Acer nikoense* (Aceraceae), et quelques représentants de cette famille ont été mis en évidence chez les Betulaceae et les Juglandaceae.

¹⁰⁶ Xiao, Y. C. et al. *Chinese. Chem. Lett.* **2011**, 22, 1457-1460.

¹⁰⁷ Jiang, Z.-H. et al. *Phytochemistry* **1996**, 43, 1049-1054.

¹⁰⁸ Jones, J. R. et al. *J. Nat. Prod.* **2010**, 74, 38-44.

A titre d'exemple, on citera l'aceroside B1 (**46**)¹⁰⁹ et l'acerogénine B (**47**)¹¹⁰ (Figure 30), isolés d'*Acer nikoense*.

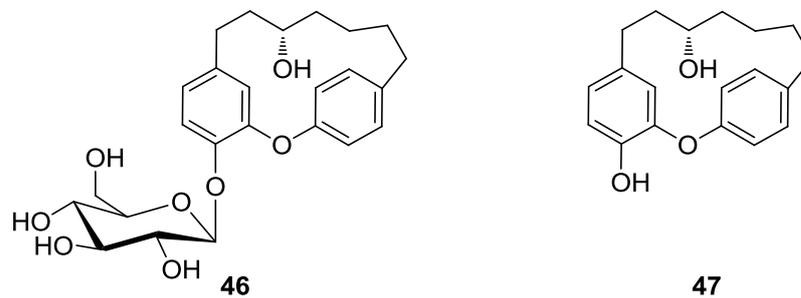


Figure 30. Structures de diaryletherheptanoïdes

L'acerogénine B (**47**) a montré une très bonne activité ostéogénique, il pourrait être un point de départ pour un programme de chimie médicinale.

1.3.1.5 Type 5 : Diarylheptanoïdes à chaînes cyclisées

Comme pour les diarylheptanoïdes du type 2, on peut diviser ce type en 3 sous catégories :

1.3.1.5.1 Diarylheptanoïdes monomères

Parmi les diarylheptanoïdes monomères du type 5 (Figure 31) on peut citer :

- La (-)-de-O-methylcentrolobine (**48**) a été isolée de *Centrolobium sclerophyllum*. Ce composé s'est montré très actif sur la forme promastigote de *Leishmania amazonensis*.⁹⁹
- La curcumalongine A (**49**), isolée de *Curcuma longa*, possède une activité inhibitrice significative de l'enzyme neuraminidase de 2 souches du virus influenza (H1N1, H9N2).¹¹¹

¹⁰⁹ Morikawa, T. et al. *J. Nat. Prod.* **2002**, *66*, 86-91.

¹¹⁰ Yonezawa, T. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3248-3251.

¹¹¹ Dao, T. T. et al. *Food. Chem.* **2012**, *134*, 21-28.

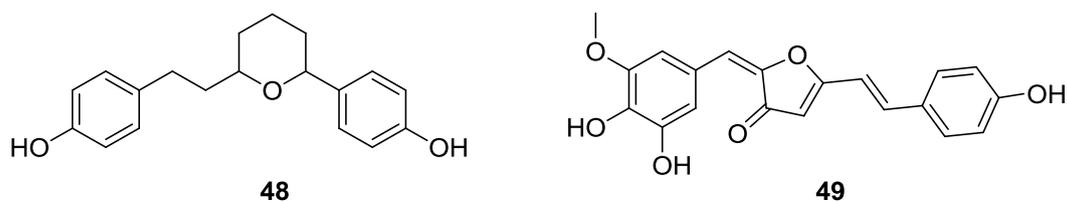


Figure 31. Structures de diarylheptanoïdes monomères du type 5

1.3.1.5.2 Diarylheptanoïdes dimères

Parmi les diarylheptanoïdes dimères du type 5, on peut citer :

- La blepharocalyxine D (**50**) (Figure 32), isolée des graines d'*Alpinia blepharocalyx*. Ce composé a montré une activité antiproliférative significative sur la lignée murine cancéreuse 26-L5 et la lignée humaine HT1080.¹¹²

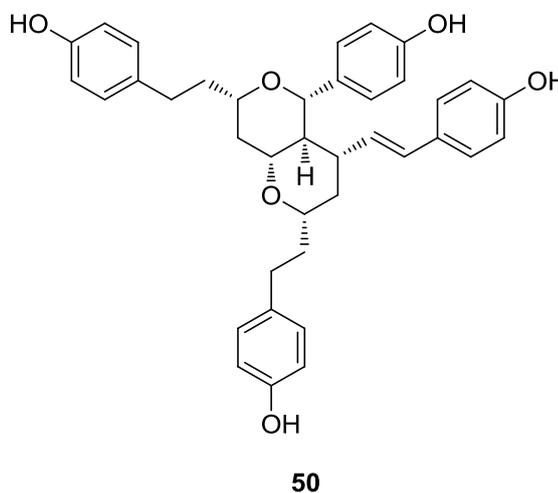


Figure 32. Structure d'un diarylheptanoïde dimère du type 5

1.3.1.5.3 Diarylheptanoïdes hybrides

Dans cette catégorie, nous retrouvons une ou deux unités diarylheptanoïdiques du type 5 greffés à d'autres types de métabolites secondaires tels que : chalcone, flavanone. Ces composés ont tous été isolés d'*Alpinia blepharocalyx*.

Parmi ces composés on citera (Figure 33) :

- L'epicalyxine F (**51**) constituée d'une partie diarylheptanoïde et d'une partie chalcone. Ce composé a montré une activité antiproliférative significative sur les lignées HT1080 et 26-L5.¹¹³

¹¹² Tezuka, Y. et al. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5903-5907.

¹¹³ Gewali, M. B. et al. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1733-1736.

- La calyxine G (**52**)¹¹⁴ est constituée d'une partie diarylheptanoïde cyclisée et d'une partie flavanone. Ce composé a montré une faible cytotoxicité sur les lignées cellulaires 26-L5 et HT1080.¹⁰⁴
- La blepharocalyxine E (**53**), est quant à elle constituée d'un diarylheptanoïde à chaîne cyclisée, un diarylheptanoïde à chaîne linéaire et d'une chalcone. Ce composé s'est montré plus actif que la blepharocalyxine D (**50**) (Figure 32) sur lignée cellulaire HT1080.¹¹²

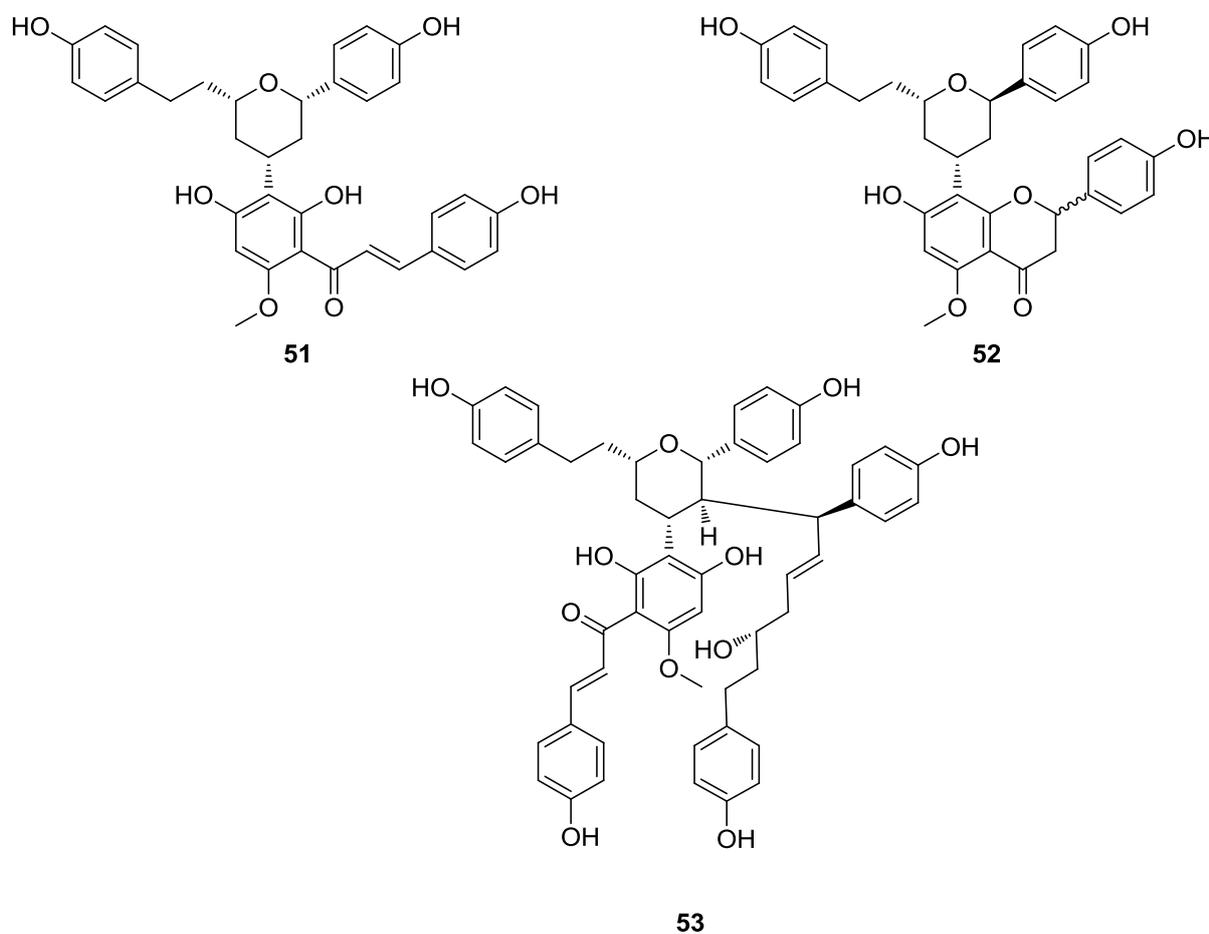


Figure 33. Structure de diarylheptanoïdes hybrides du type 5

¹¹⁴ Kumar Prasain, J. et al. *J. Chem. Res. (S)* **1998**, 22-23.

2-Travaux personnels

2.1 Étude phytochimique de *Pyrostria major*

2.1.1 Récolte et identification

Les feuilles de *Pyrostria major* (A. Rich & DC.) Cavaco ont été récoltées en Septembre 2005 à Mahanoro, forêt tropicale de l'Est de Madagascar (Figure 34). La plante a été identifiée par Armand Rakotozafy par comparaison avec un échantillon authentique déposé au Département de Botanique du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza, Antananarivo. L'identification botanique a été confirmée par le Dr. Sylvain Razafimandimbison (The Bergius Foundation, Royal Swedish Academy of Sciences, Se-10504, Stockholm, Sweden). Un échantillon (MAD-0086) a été déposé à l'herbier de l'Institut Malgache de Recherches Appliquées.



Figure 34. Carte de Madagascar, localisation du lieu de récolte à Mahanoro (A)

2.1.2 Extraction et purification des diarylheptanoïdes glycosylés

Les feuilles séchées et broyées (375 g) de *Pyrostria major* (récolte MAD-0086) ont été extraites par l'acétate d'éthyle puis par le méthanol. Treize grammes d'extrait acétate d'éthyle et 53 grammes d'extrait méthanolique ont été obtenus.

L'extrait AcOEt (10 g) a été fractionné sur une colonne ouverte de silice (CC) en suivant un gradient $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0 à 8:2) de polarité croissante. Seize fractions (F.1-F.16) ont été obtenues et rassemblées en fonction de leurs profils en chromatographie sur couche mince (CCM). Ces fractions ont été soumises aux tests biologiques sur la souche FcB1 du *P. falciparum*. L'activité biologique a été détectée au niveau de la fraction F.5 avec un pourcentage d'inhibition

de 100 % à 1 µg/mL. La fraction F.5 s'est avérée contenir du β sitostérol. La richesse et la complexité des fractions F.15 et F.16 nous ont amené à les purifier par CLHP préparative, obtenant ainsi une série de huit diarylheptanoïdes glycosylés (**54-61**) (Figure 36).

Le schéma de fractionnement avec les rendements d'extraction et les activités biologiques antiplasmodiale (FcB1) est présenté Figure 35. La détermination structurale des diarylheptanoïdes glycosylés sera détaillée dans les pages suivantes.

Les spectres RMN 1D et 2D du composé 1 (**54**) sont présentés en Annexe 2. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des composés 2-8 (**55-61**) sont présentés en Annexe 3. Pour faciliter la lecture, les structures des composés isolés de *P. major* (**54-61**) ainsi que les composés hémisynthétiques (**62-70**) obtenus sont représentées sur le volet dépliant de l'Annexe 4.

Tous les produits isolés de *Pyrostria major* ont été obtenus sous une forme optiquement active. La configuration absolue des composés (**54-57**) a été déterminée à l'aide de la méthode de l'"Exciton Chirality" après modification chimique, donnant des composés exploitables pour une expérience de dichroïsme circulaire. L'étude configurationnelle des diarylheptanoïdes glycosylés fera l'objet de la partie **2.2**.

L'activité biologique des composés naturels et hémisynthétiques sera détaillée dans la partie **2.3**.

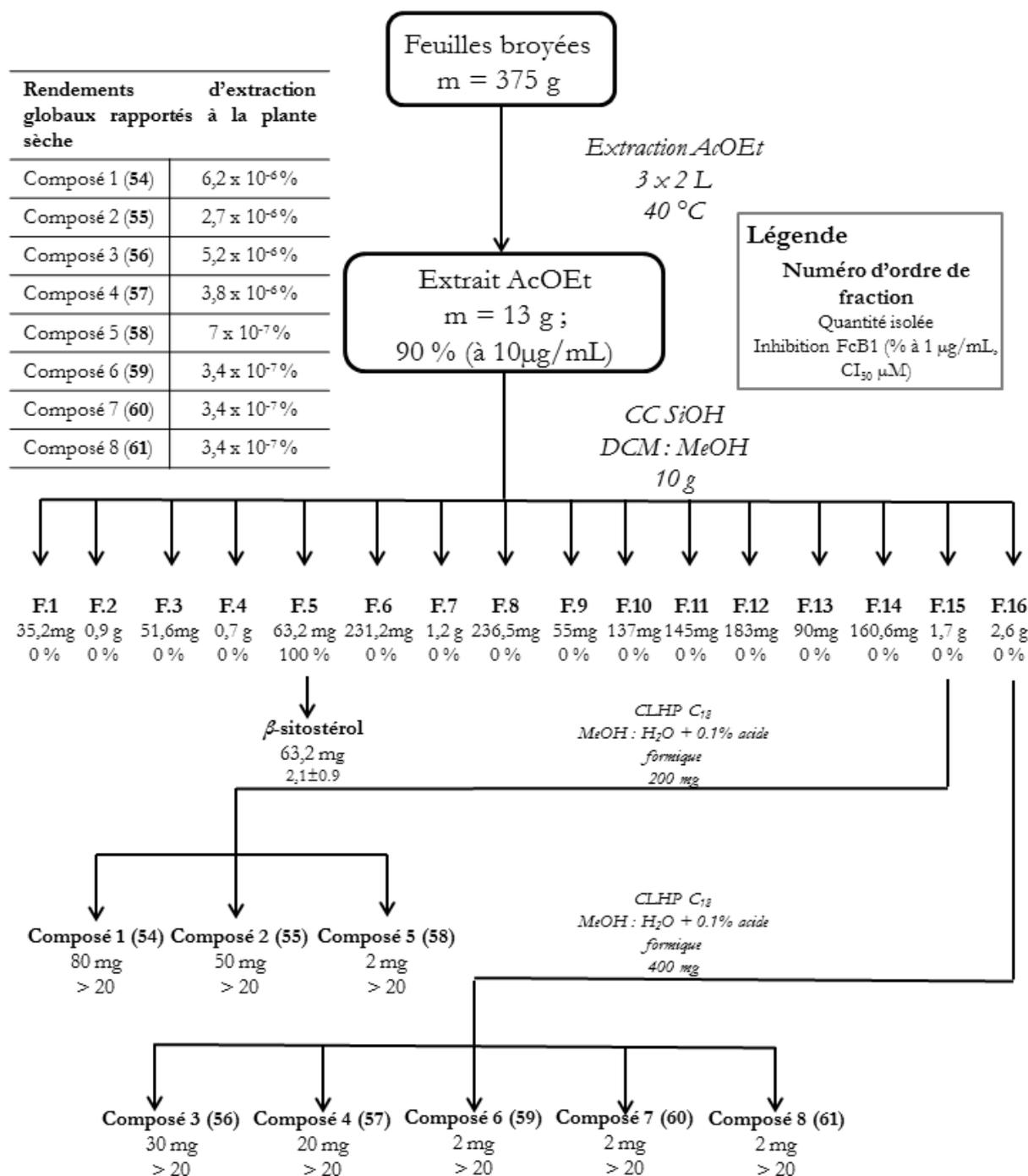
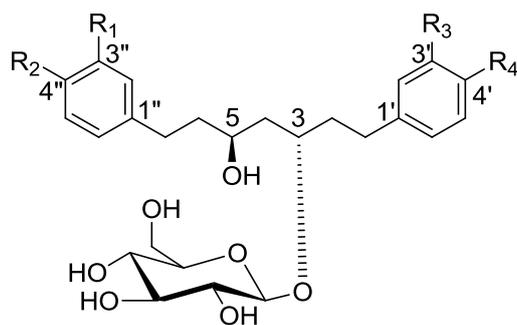
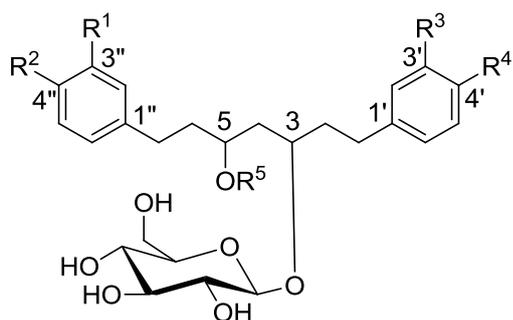


Figure 35. Schéma de purification des composés isolés des feuilles de *Pyrostria major* et activité biologique sur FcB1 (exprimée en pourcentage d'inhibition à 1 µg/mL pour les fractions ou en CI₅₀ µM pour les produits purs)



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Composé 1 (54)	H	OMe	H	OMe
Composé 2 (55)	H	OMe	OH	OMe
Composé 3 (56)	H	OMe	OH	OH
Composé 4 (57)	OH	OH	OH	OH



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Composé 5 (58)	OH	OMe	H	OMe	H
Composé 6 (59)	OH	OMe	OH	OH	H
Composé 7 (60)	H	OMe	OH	OH	CHO
Composé 8 (61)	OH	OH	OH	OH	CHO

Figure 36. Composés isolés des feuilles de *Pyrostria major*

2.1.3 Caractérisation des composés isolés

La structure des composés isolés de *Pyrostria major* a été déterminée par l'analyse des données spectroscopiques (UV, DC, SM) et RMN. Le spectre RMN du proton suggère la présence de noyaux aromatiques substitués, une chaîne aliphatique ainsi qu'un proton anomérique indiquant la présence d'un sucre. Dans cette section, l'élucidation de la structure plane du composé 1 (**54**) (Figure 36) sera détaillée. L'analyse des autres composés mettra l'accent sur les différences observées au sein de la série.

Les structures des composés isolés sont représentées sur le volet dépliant de l'Annexe 4.

2.1.3.1 Le composé 1

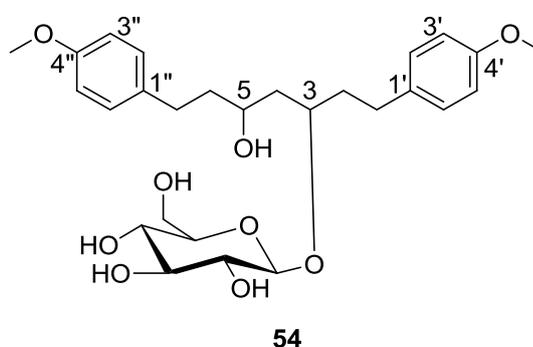


Figure 37. Structure plane du composé 1 (**54**)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 529,2406 correspondant à la formule brute $C_{27}H_{38}O_9$. Le composé présente donc 9 insaturations.

- **Spectre RMN du proton :**

Le spectre du proton (Figure 38) indique 4 signaux aromatiques à δ_H 6,80 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-) ; 6,81 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H) ; 7,09 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H) et 7,14 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H) (encadré bleu) suggérant la présence de deux noyaux aromatiques 1,4 disubstitués. De plus, on peut aussi noter la présence de deux signaux pour deux groupes méthoxy à δ_H 3,74 et 3,75 (encadré rouge) et d'un signal pour un proton anomérique à δ_H 4,39 (d, $J = 7,8$ Hz) (encadré marron) suggérant la présence d'un sucre en configuration β . Enfin on distingue aisément les protons aliphatiques blindés se situant entre δ_H 1,6 et 2,7 (à droite du spectre) et les protons déblindés de la partie osidique se situant entre δ_H 3,18 et 3,97.

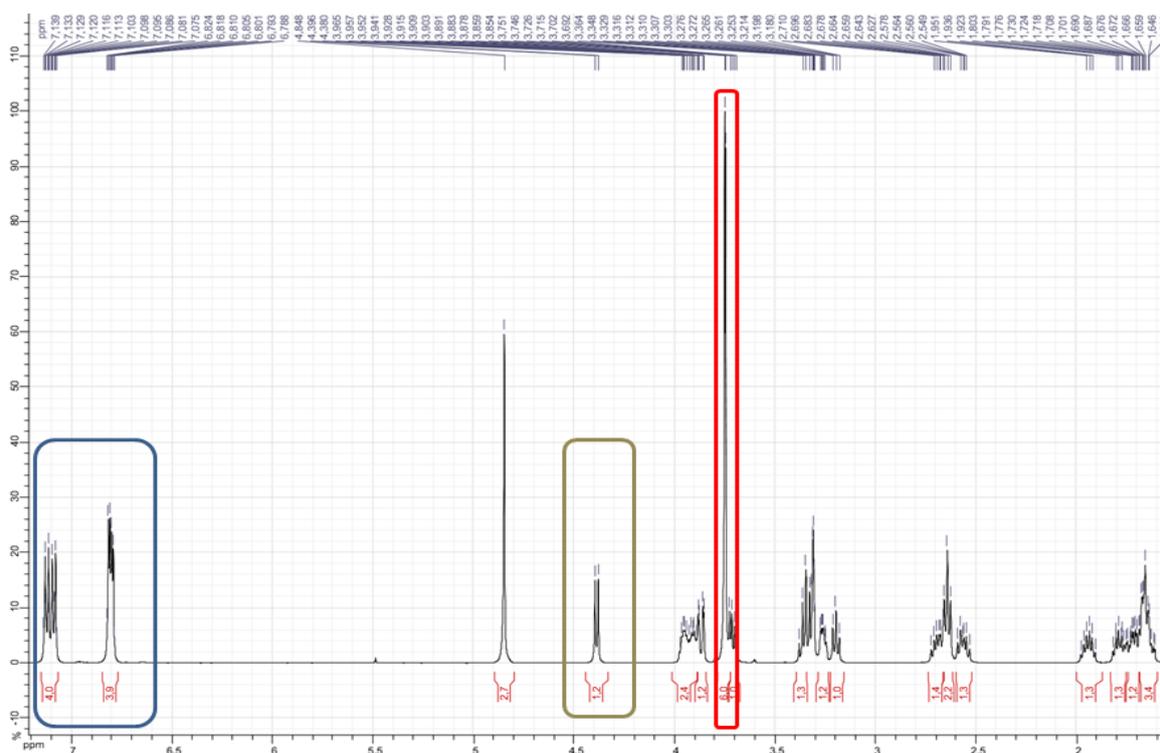


Figure 38. Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 1 (54) dans le CD_3OD .

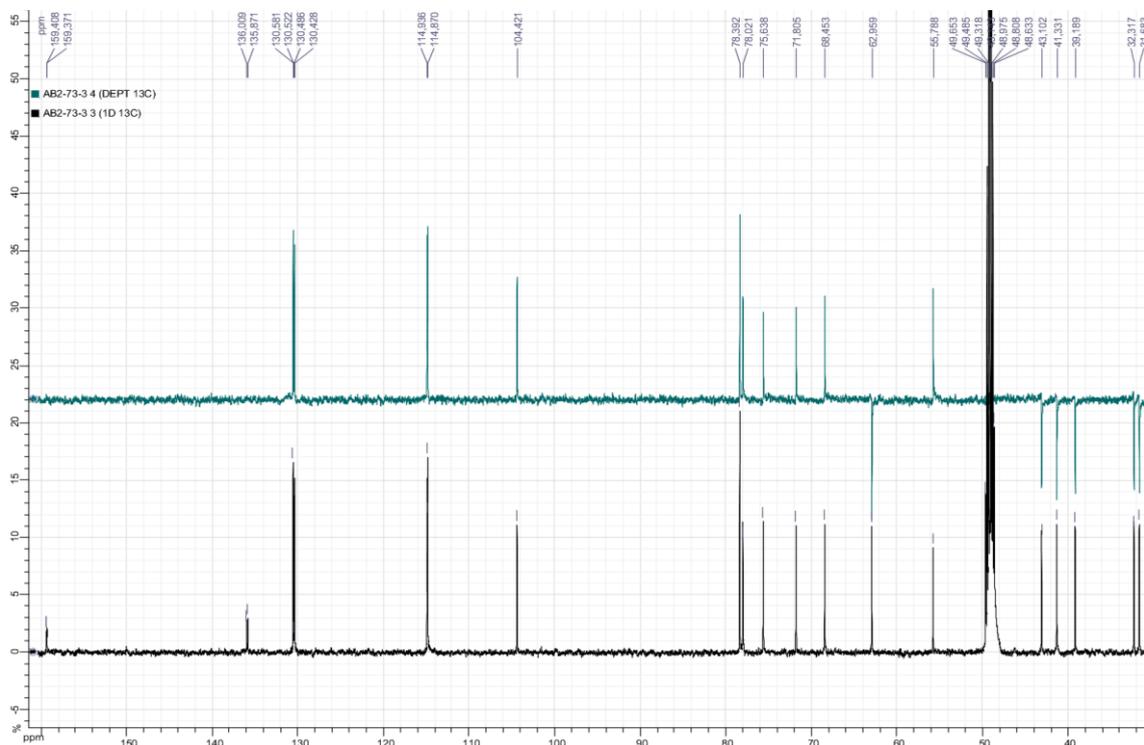


Figure 39. Spectres RMN ^{13}C (en noir) et DEPT 135 (en vert) (125 MHz) du composé 1 (54) dans le CD_3OD .

• Spectres RMN ^{13}C et DEPT-135

Le spectre du ^{13}C mis en regard du DEPT-135 (Figure 39), indique la présence de 12 carbones aromatiques et de 15 carbones d'hybridation sp^3 , dont 5 méthylènes et deux hydroxyméthines pour la partie aliphatique, un hydroxyméthylène et 5 méthines pour la partie osidique, et deux groupes méthoxy à δ_{C} 55,7. Tous ces signaux sont en faveur d'un squelette de type diarylheptanoïde glycosylé.

• Attribution des protons aux carbones : spectre HSQC

Les corrélations hétéronucléaires 1J proton-carbone (HSQC) ont permis d'attribuer les protons reliés à chaque carbone

Tableau II. Données RMN du composé 1 (54) (CD_3OD , 500 MHz)

C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) (multiplicité, J en Hz)
1	31,6	2,64 (t, 8,5)
2	39,1	1,79, 1,93 (m)
3	78,3	3,96 (m)
4	43,1	1,61-1,75 (m)
5	68,4	3,91 (m)
6	41,3	1,61-1,75 (m)
7	32,3	2,56, 2,68 (m)
1'	136,0	
2'	130,5	7,14 (d, 8,5)
3'	114,9	6,80 (d, 8,5)
4'	159,4	
5'	114,9	6,80 (d, 8,5)
6'	130,5	7,14 (d, 8,5)
1''	135,8	
2''	130,4	7,09 (d, 8,5)
3''	114,8	6,81 (d, 8,5)
4''	159,3	
5''	114,8	6,81 (d, 8,5)
6''	130,4	7,09 (d, 8,5)
GC 1	104,4	4,39 (d, 7,8)
Glc 2	75,6	3,19 (t, 8,5)
GC 3	78,3	3,34 (m)
GC 4	71,8	3,33 (m)
Glc 5	78,0	3,26 (m)
Glc 6	62,9	3,71 (dd, 11,8 ; 5,5) ; 3,87 (dd, 11,8 ; 2,7)
4'-OMe	55,7	3,74 (s)
4''-OMe	55,7	3,75 (s)

- **Analyse des spectres 2D COSY et HMBC**

Tous les fragments ont été reliés à la chaîne aliphatique en se basant sur l'analyse des corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HMBC. Les corrélations HMBC de C-7 avec H-2'' et H-6'', et de H-2' et H-6' avec C-1 permettent de placer les 2 cycles aromatiques en bout de chaîne. De plus, la partie osidique a pu être attachée au C-3 grâce à la corrélation HMBC observée entre le proton anomérique à δ_H 4,39 et le C-3 à δ_C 78,3. Enfin, les 2 méthoxyles ont pu être reliés aux groupements aromatiques par les corrélations observées entre les protons à δ_H 3,74 et 3,75 et les carbones C-4' (δ_C 159,4) et C4''(δ_C 159,3), respectivement. Toutes ces connectivités sont similaires à celles décrites par Yokosuka¹¹⁵ sur la série de diarylheptanoïdes glycosylés qu'il a isolée du rhizome de *Tacca chantrieri*.

- **Identification du sucre**

L'hydrolyse acide du composé (**54**) a conduit à l'obtention du composé **62** ainsi que du D-glucose. Le D-glucose a été analysé par Chromatographie Super Critique (SFC) sur une colonne chirale par comparaison avec des références de D- et L-glucose (Figure 40).

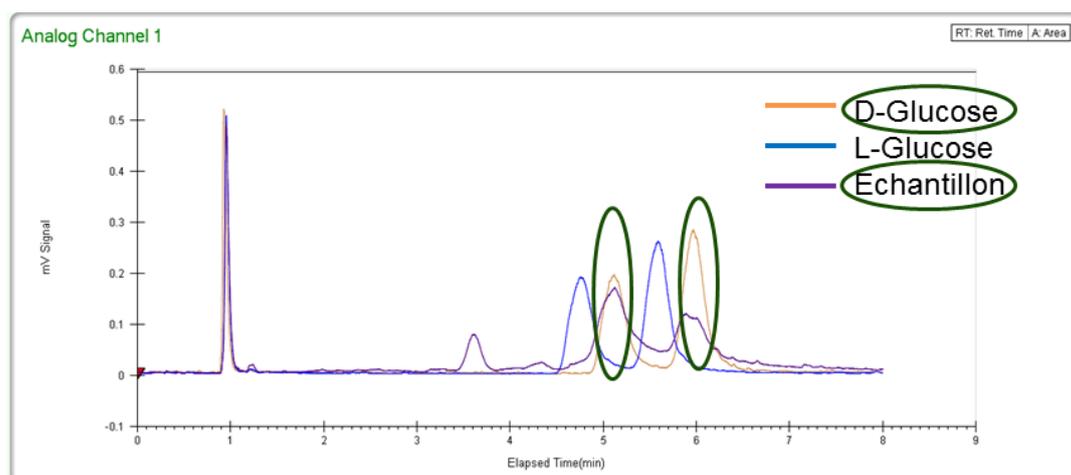


Figure 40. Chromatogramme de l'analyse par SFC des témoins (D- et L-glucose) et de l'échantillon (détection DEDL).

¹¹⁵ Yokosuka, A. et al. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 283-289.

2.1.3.2 Le composé 2

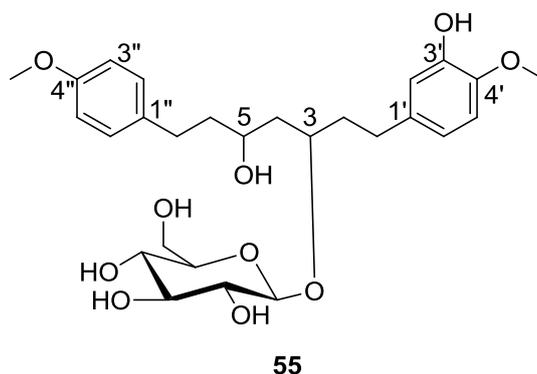


Figure 41. Structure plane du composé 2 (55)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 545,2410 correspondant à la formule brute $C_{27}H_{38}O_{10}$.

Le spectre RMN du 1H fait apparaître des signaux correspondant à des groupements aromatiques 1,3,4 trisubstitués et 1,4 disubstitués, et des signaux pour deux méthoxyles. Ces derniers ont pu être reliés aux groupements aromatiques grâce aux corrélations HMBC observées entre les protons δ_H 3,72 et 3,78 et les carbones aromatiques C-4'' (δ_C 159,3) et C'4' (δ_C 147,1), respectivement. De plus, la partie osidique a pu être attachée au C-3 grâce à la corrélation HMBC observée entre le proton anomérique à δ_H 4,39 et le C-3 à δ_C 78,3. L'hydrolyse acide du composé 2 et l'analyse de l'hydrolysats, selon la procédure employée pour le composé 1, ont permis d'identifier la partie osidique comme étant du D-glucose.

2.1.3.3 Le composé 3

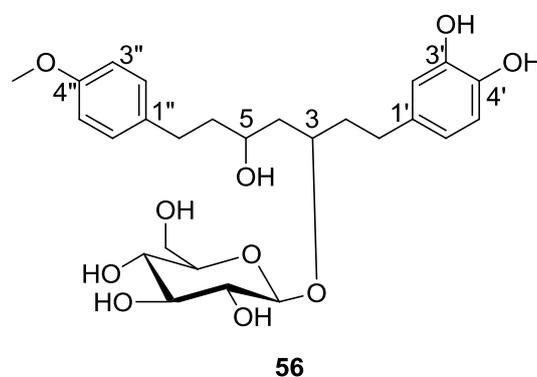


Figure 42. Structure plane du composé 3 (56)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 531,2285 correspondant à la formule brute $C_{26}H_{36}O_{10}$.

Le spectre RMN du 1H fait apparaître des signaux correspondant à des groupements aromatiques 1,3,4 trisubstitués et 1,4 disubstitués, et un signal pour un seul méthoxy. Ce dernier a pu être relié au groupement aromatique grâce à la corrélation HMBC observée entre le proton δ_H 3,74 et le carbone aromatique C-4'' (δ_C 159,4). De plus, la partie osidique a pu être attachée au C-3 grâce à la corrélation HMBC observée entre le proton anomérique à δ_H 4,39 et le C-3 à δ_C 78,4. L'hydrolyse acide du composé 3 et l'analyse de l'hydrolysate, selon la procédure employée pour le composé 1, ont permis d'identifier la partie osidique comme étant du D-glucose.

2.1.3.4 Le composé 4

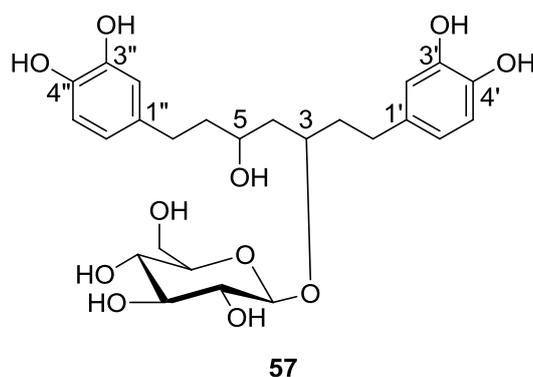


Figure 43. Structure plane du composé 4 (57)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 533,2015 correspondant à la formule brute $C_{25}H_{34}O_{11}$.

Le spectre RMN du 1H fait apparaître des signaux correspondant à six protons aromatiques. Le spectre RMN du ^{13}C fait apparaître des signaux correspondant à 4 carbones oxygénés d'hybridation sp^2 (δ_C 144,2, 144,3, 146,1 et 146,2), suggérant ainsi la présence de deux groupements 3,4-dihydroxyphenyl. L'hydrolyse acide du composé 4 et l'analyse de l'hydrolysate, selon la procédure employée pour le composé 1, ont permis d'identifier la partie osidique comme étant du D-glucose. A ce stade, les données spectroscopiques décrites pour le composé 4 correspondent aux données d'un composé décrit dans la littérature par Yokosuka.¹¹⁵ Dans la section suivante, la détermination de la stéréochimie absolue du composé 4 confirmera qu'il s'agit d'un composé diastéréoisomère du composé déjà décrit.

2.1.3.5 Le composé 5

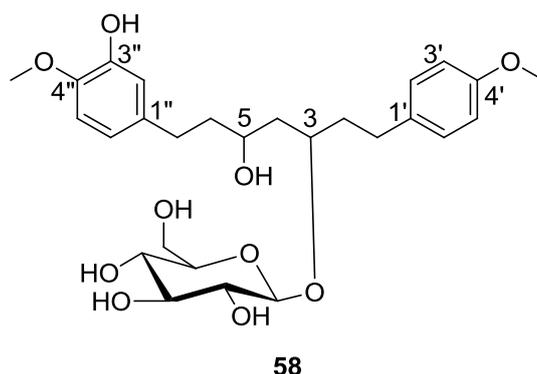


Figure 44. Structure plane du composé 5 (58)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 545,2404 correspondant à la formule brute $C_{27}H_{38}O_{10}$.

La partie osidique a pu être attachée au C-3 grâce à la corrélation HMBC observée entre le proton anomérique à δ_H 4,39 et le C-3 à δ_C 78,4. D'autres corrélations HMBC indiquent clairement que le composé 5 est un isomère du composé 2 (Figure 41).

2.1.3.6 Le composé 6

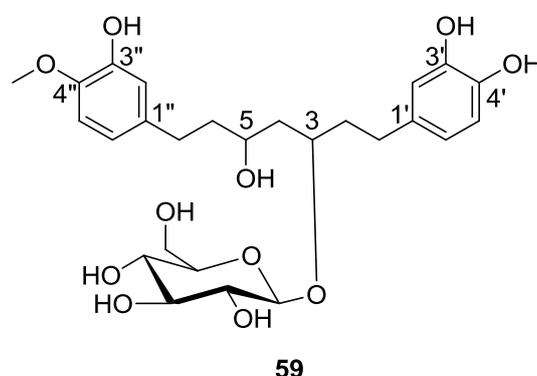


Figure 45. Structure plane du composé 6 (59)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 547,2166 correspondant à la formule brute $C_{26}H_{36}O_{11}$.

Le spectre RMN du 1H fait apparaître des signaux correspondant à six protons aromatiques ainsi qu'un méthoxy. Le spectre RMN du ^{13}C fait apparaître des signaux correspondant à 4 carbones oxygénés d'hybridation sp^2 (δ_C 144,2, 146,1, 147,2 et 147,5), suggérant ainsi la présence de deux groupements 3,4-dihydroxyphényle. La proximité des résonances des carbones C-3'' (δ_C 147,5) et C-4'' (δ_C 147,2) rend difficile la localisation du

groupement méthoxyle. Cette ambiguïté a été levée grâce à l'étude du spectre 2D NOESY (Figure 46). En effet, la corrélation NOESY observée entre le proton aromatique H-5'' à δ_H 6,80 et les protons du groupement méthoxy à δ_H 3,81, permet de relier le méthoxyle au carbone aromatique C-4''.

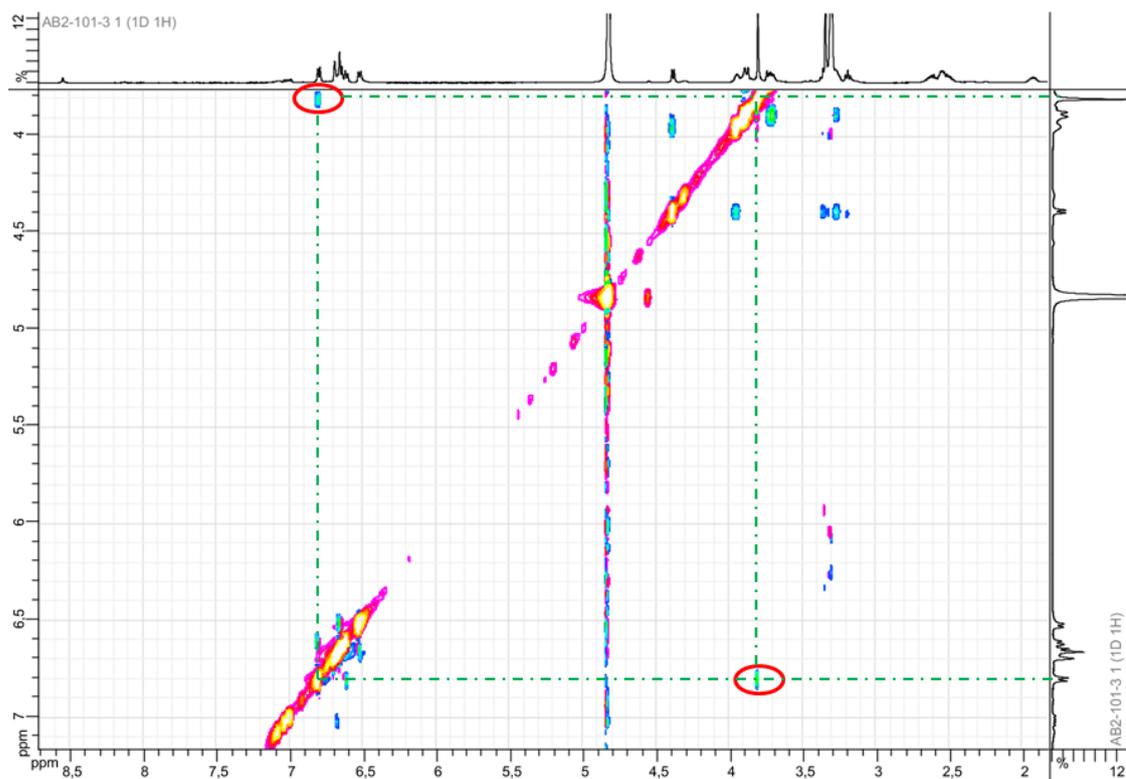


Figure 46. Agrandissement du spectre NOESY (500 MHz, CD₃OD) du composé 6

2.1.3.7 Le composé 7

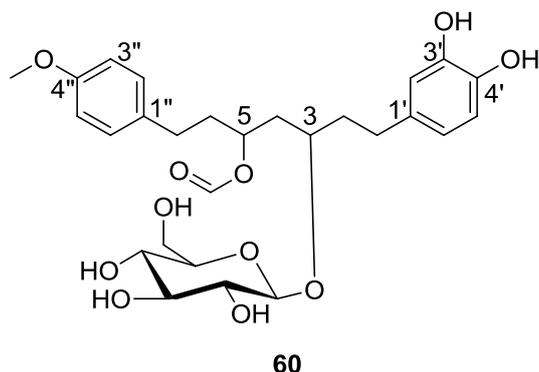


Figure 47. Structure plane du composé 7 (60)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 559,2241 correspondant à la formule brute $C_{27}H_{36}O_{11}$.

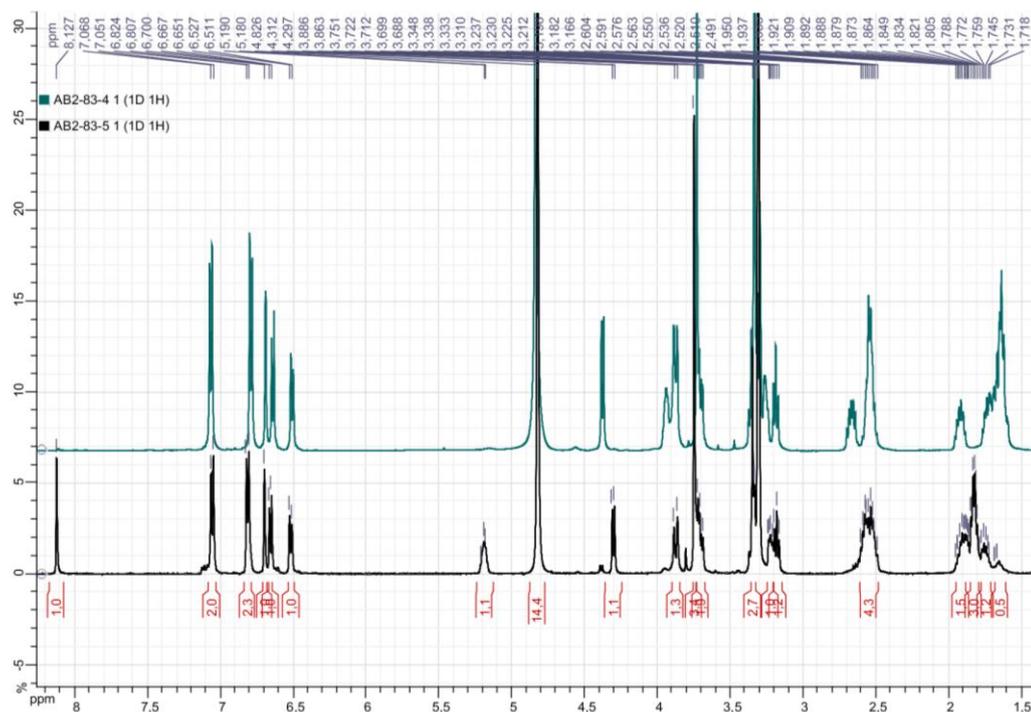


Figure 48. Comparaison des spectres RMN du 1H des composés 3 (en vert) et 7 (en noir)

Lorsque les spectres RMN du ^1H et du ^{13}C DEPT-135 du composé 7 et du composé 3 sont comparés, il apparaît clairement que ces deux composés sont très proches. Cependant, on notera, la présence de signaux supplémentaires déblindés à δ_{H} 5,19 et 8,12 et à δ_{C} 163,5 sur les spectres du composé 7 (

Figure 48). Parallèlement à ces observations, on peut ajouter aussi que le spectre IR du composé 7 indique une bande d'absorption très intense à 1710 cm^{-1} , confirmant la présence d'un groupement formyloxy.¹¹⁶

La corrélation HMBC observée entre le proton à δ_{H} 8,12 et le carbone aliphatique C-5 à δ_{C} 73,1, permet de relier le groupement formyloxy au carbone C-5.

2.1.3.8 Le composé 8

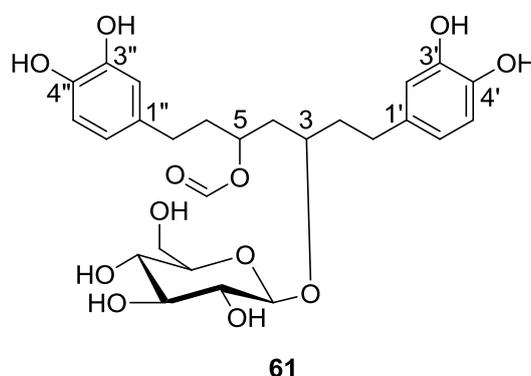


Figure 49. Structure plane du composé 8 (61)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudo moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 561,2037 correspondant à la formule brute $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$.

Les spectres RMN du ^1H et du ^{13}C des composés 4 et 8 présentent beaucoup de similitudes. On constate la présence de signaux supplémentaires déblindés caractéristiques du groupement formyle comme dans le cas du composé 7. Enfin, la corrélation HMBC observée entre le proton à δ_{H} 8,12 et le carbone aliphatique C-5 à δ_{C} 73,1, permet de relier le groupement formyloxy au carbone C-5.

¹¹⁶ Benyahia, S. et al. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 627-632.

2.2 Détermination de la configuration absolue des diarylheptanoïdes glycosylés

Comme cela a été évoqué dans la section précédente, les travaux de Yokosuka¹¹⁵ ont conduit à une série de composés très proches structurellement de ceux isolés de *Pyrostria major*.

Afin de déterminer la configuration absolue de ses composés, Yokosuka a employé la méthode de l'"Exciton chirality"¹¹⁷ appliquée aux systèmes 1,3 dibenzoate acycliques.¹¹⁸ Nous avons décidé d'employer également cette méthode afin d'étudier la stéréochimie de nos composés.

Avant de détailler les étapes qui nous ont permis de déterminer la configuration absolue des diarylheptanoïdes glycosylés, nous détaillerons dans la section suivante les principes généraux de l'"Exciton chirality" et ses applications.

2.2.1 L'"Exciton chirality"

2.2.1.2 Théorie de l'"Exciton chirality"

L'interprétation des spectres de dichroïsme circulaire (DC) peut être faite par comparaison avec les données chiroptiques de composés connus ou du moins proches structurellement. Une autre façon d'interpréter les spectres de DC consiste en l'application de « règles » de DC comme la règle de l'octant¹¹⁹ ou la méthode de l'"Exciton chirality" (EC), ces règles nécessitent cependant de remplir des conditions particulières au niveau structural.¹²⁰

En effet, dans le cas de l'EC, la condition essentielle est la préexistence ou l'introduction de chromophores, identiques et adjacents aux centres chiraux, indispensables à l'obtention du phénomène de DC.

L'EC résulte de l'interaction de deux chromophores proches dans l'espace et plus précisément de l'interaction de leurs moments dipolaires de transition (μ_1 et μ_2) (Figure 50). A l'issue de cette interaction, les deux chromophores verront leurs états excités se splitter en deux nouveaux niveaux (α et β) séparés par une quantité d'énergie $\Delta E = 2V_{12}$ (Figure 51). Ce phénomène, appelé le split de Davydov, est à l'origine des effets Cotton observés sur le spectre de DC.

¹¹⁷ Harada, N. et al. *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 257-263.

¹¹⁸ Harada, N. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3842-3850.

¹¹⁹ Moffitt, W. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4013-4018.

¹²⁰ Berova, N. et al. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 914-931.

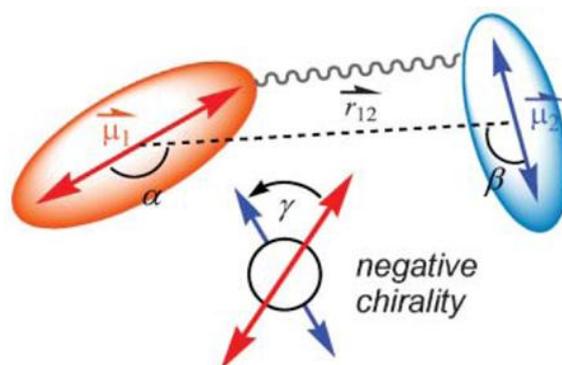


Figure 50. Interaction du moment dipolaire de deux chromophores dans l'espace¹²⁰

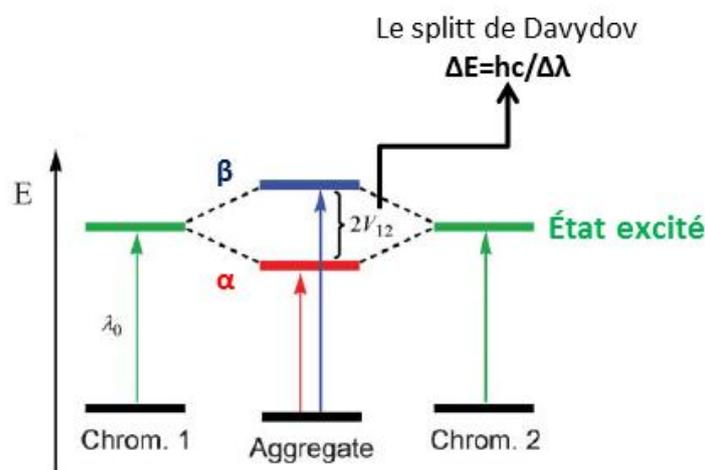


Figure 51. Split de Davydov¹²⁰

2.2.1.3 Règles d'interprétation du spectre de DC

L'utilité de l'EC réside dans le fait de pouvoir interpréter et corrélérer le signe des effets Cotton, observés sur un spectre de DC, à la configuration absolue d'une molécule.

Harada et Nakanishi¹¹⁷ ont établi des règles d'interprétations basées sur le signe de la chiralité (positive ou négative) extrapolée à partir du spectre de DC. En effet, on parlera de chiralité positive si le spectre de DC fait apparaître, en premier, un effet Cotton positif (aux grandes longueurs d'onde) suivi d'un effet Cotton négatif. Evidemment, nous parlerons de chiralité négative si le spectre de DC fait apparaître, en premier, un effet Cotton négatif (aux grandes longueurs d'onde) suivi d'un effet Cotton positif. (Figure 52)

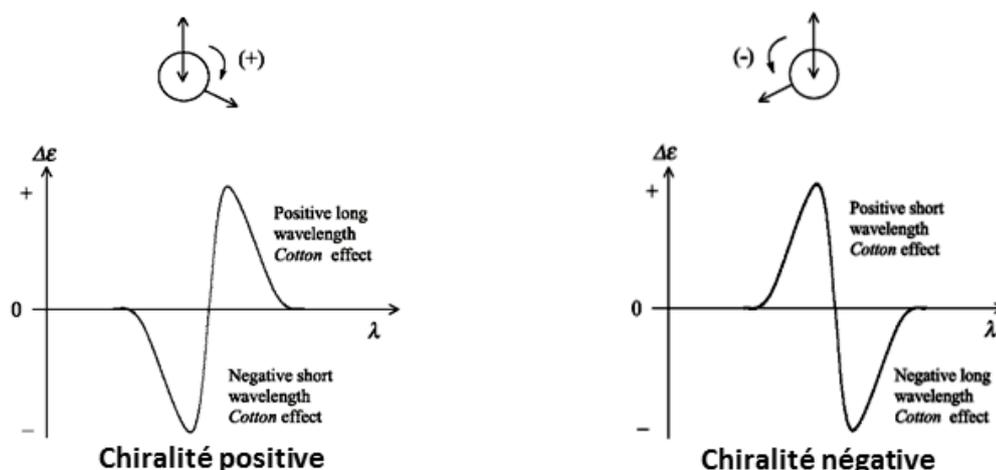


Figure 52. Signes de chiralité et signes d'effet Cotton¹²¹

Une fois que les effets Cotton, observés sur le spectre de DC, ont été interprétés et que le signe de chiralité a été déterminé, la dernière étape consiste à apprécier le type d'agencement dans lequel se trouvent les chromophores à l'origine du phénomène d'EC.

Comme on peut l'observer sur la Figure 52, dans le cas d'une chiralité positive (à gauche), les deux chromophores, schématisés par deux doubles flèches, sont agencés dans le sens horaire. En revanche, dans le cas d'une chiralité négative (à droite), les deux chromophores sont agencés dans le sens antihoraire.

2.2.1.4 Applications de l'EC aux systèmes 1,3 dibenzoate acycliques¹¹⁸

Le motif 1,3 diol est fréquemment rencontré dans des composés biologiquement actifs tels que certains macrolides.¹²² C'est pour cette raison que certains auteurs se sont penchés sur le développement de méthodes permettant la détermination de la stéréochimie de ce type de motif.¹²³

La méthode de l'EC a longtemps été employée sur des systèmes cycliques.¹²⁴ C'est à partir des années 1990 que cette dernière a été élargie aux systèmes acycliques.

En étudiant le motif 1,3 dibenzoate (Figure 53), Harada et Nakanishi ont constaté que la conformation *anti* la plus stable, adoptait majoritairement une forme plane en zigzag à l'origine

¹²¹ Boiadjev, S. E. et al. *Monatsh. Chem.* **2005**, *136*, 489-508.

¹²² Konno, K. et al. *Chirality* **2002**, *14*, 72-80.

¹²³ Seco, J. M. et al. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3261-3264.

¹²⁴ Zhao, N. et al. *Chirality* **1995**, *7*, 636-651.

de deux effets Cotton caractéristiques. En revanche, ils ont noté que la conformation *syn* la plus stable adoptait une forme planaire en zigzag qui ne produisait pas de phénomène de DC.

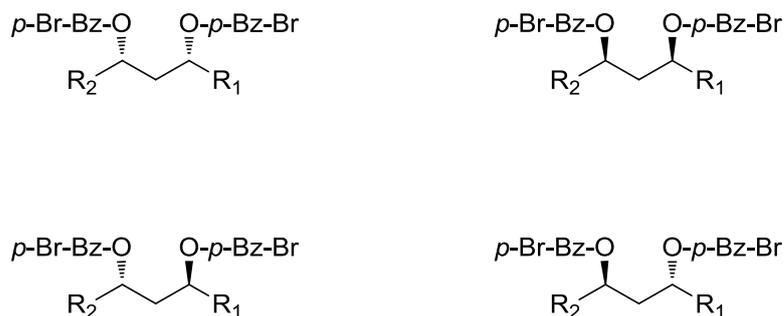


Figure 53. Différentes conformations du motif 1,3 dibenzoate (*syn* en haut) et (*anti* en bas)

De ce fait, seules les conformations *anti* peuvent être étudiées par DC. Il en résulte deux stéréochimies possibles correspondant à deux signes de chiralités opposées (Figure 54) qui seront appréciées en fonction du signe des effets Cotton observés sur le spectre de DC. (Figure 52).

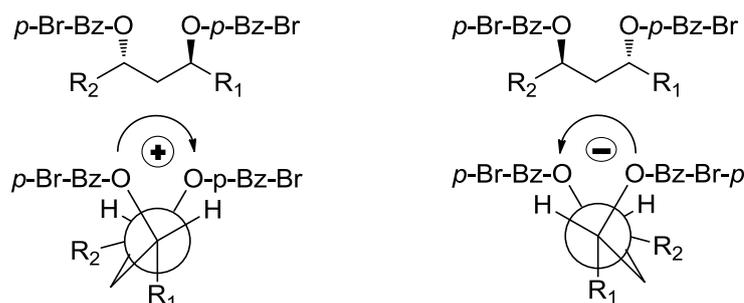


Figure 54. Signes de chiralités des deux conformations *anti*

Il faut noter que les conformations *syn* pourront, tout de même, être étudiées par la méthode modifiée de Mosher.^{122,125} ou par la méthode de Riguera.¹²⁶

2.2.2 Application de l'EC au composé 1 (54)

• Dérivatisation chimique du composé 1

Afin d'appliquer la méthode l'EC sur le composé 1 (54), des modifications structurales sont nécessaires. En effet, comme il a été évoqué dans la section précédente, la méthode de l'EC est basée sur la présence de chromophores adjacents aux centres chiraux.

¹²⁵ Kusumi, T. et al. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4731-4734.

¹²⁶ Seco, et al. *Org. Lett.* **2000**, 2, 3261-3264.

Ces modifications ont commencé par l'hydrolyse de la liaison osidique conduisant au composé **62**, suivie par l'estérification du motif 1,3 diols par un chromophore du type *p*-bromobenzoate pour aboutir au composé **63**, exploitable pour une expérience de DC (Figure 55).

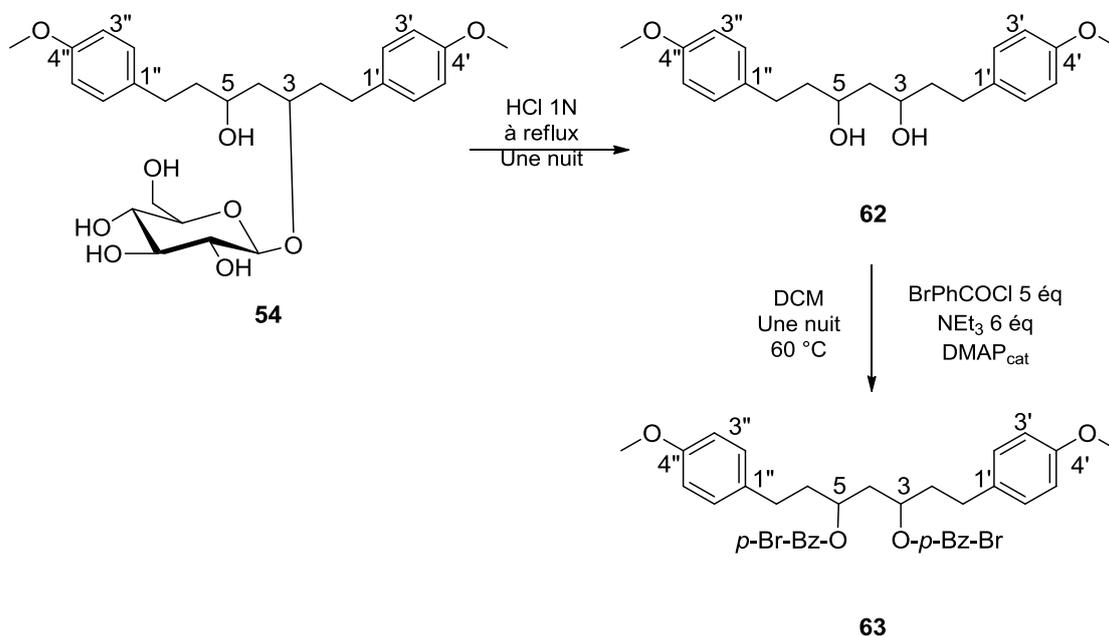


Figure 55. Dérivatisation du composé 1 (**54**)

- Enregistrement et interprétation du spectre de DC

Le spectre de DC du composé **63** (Figure 56) fait apparaître un effet Cotton positif à 258,7 nm suivi d'un effet Cotton négatif à 237,5 nm, ce qui correspond à une chiralité positive. En se référant à la Figure 54, il apparaît clairement qu'une chiralité positive correspond à un motif 1,3 dibenzoate de configuration absolue *3S*, *5S*. Cette stéréochimie peut être rapportée au composé 1 (**54**) qui se nomme donc *(3S, 5S)*-3,5-dihydroxy-1,7-bis (4-méthoxyphényl)-heptyl 3-*O*- β -D-glucopyranoside.

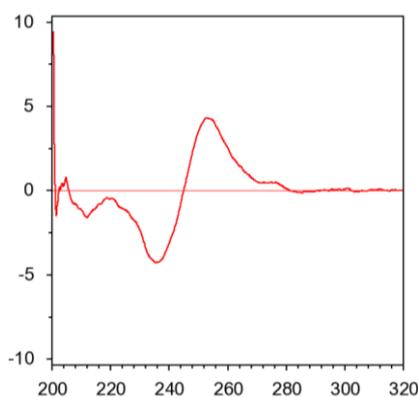


Figure 56. Spectre de DC du composé **63**

2.2.3 Application de l'EC au composé 2 (55)

- **Dérivatisation chimique du composé 2 (55)**

Afin d'obtenir un composé exploitable en DC, le composé 2 (55) subit une hydrolyse acide (composé 64) suivie d'une méthylation (composé 65) et d'une estérification pour donner le composé (66) (Figure 57).

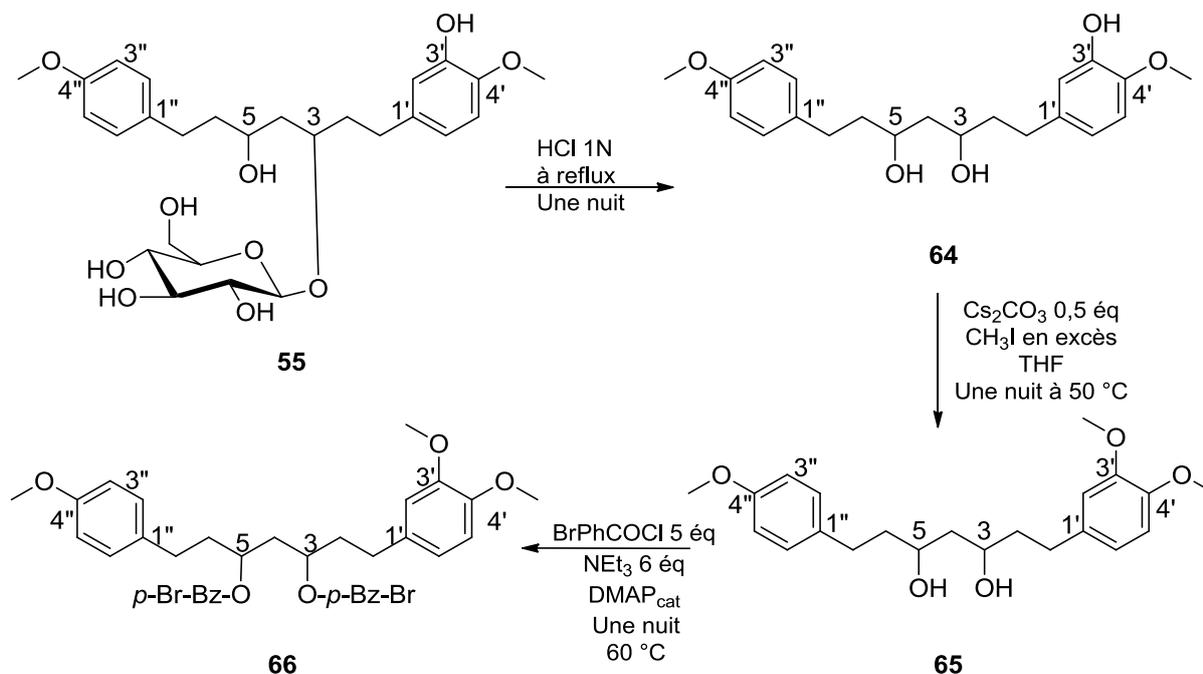


Figure 57. Dérivatisation du composé 2 (55)

- **Enregistrement et interprétation du spectre de DC**

Le spectre de DC du composé 66 fait apparaître un effet Cotton positif à 252,7 nm suivi d'un effet Cotton négatif à 235,5 nm similaires au spectre du composé 63 (Figure 58).

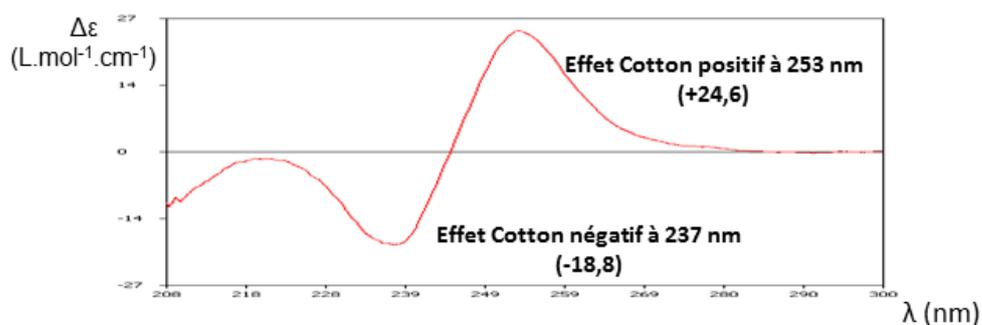


Figure 58. Spectre de DC du composé 66 (Ethanol)

De ce fait le composé (55) est le : (3*S*, 5*S*)-3,5-dihydroxy-1-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)-7-(4-méthoxyphényl)-heptyl-3-*O*- β -D-glucopyranoside.

2.2.4 Application de l'EC au composé 3 (56)

• Dérivatisation chimique du composé 3 (56)

Le composé 3 (56) subit une hydrolyse acide (composé 67) suivie d'une méthylation qui conduit au composé 65 (Figure 59). Cela nous a permis de déterminer la configuration absolue du composé 3 (56) qui est le (3*S*, 5*S*)-3,5-dihydroxy-1-(3,4-hydroxyphényl)-7-(4-méthoxyphényl)-heptyl-3-*O*-β-D-glucopyranoside.

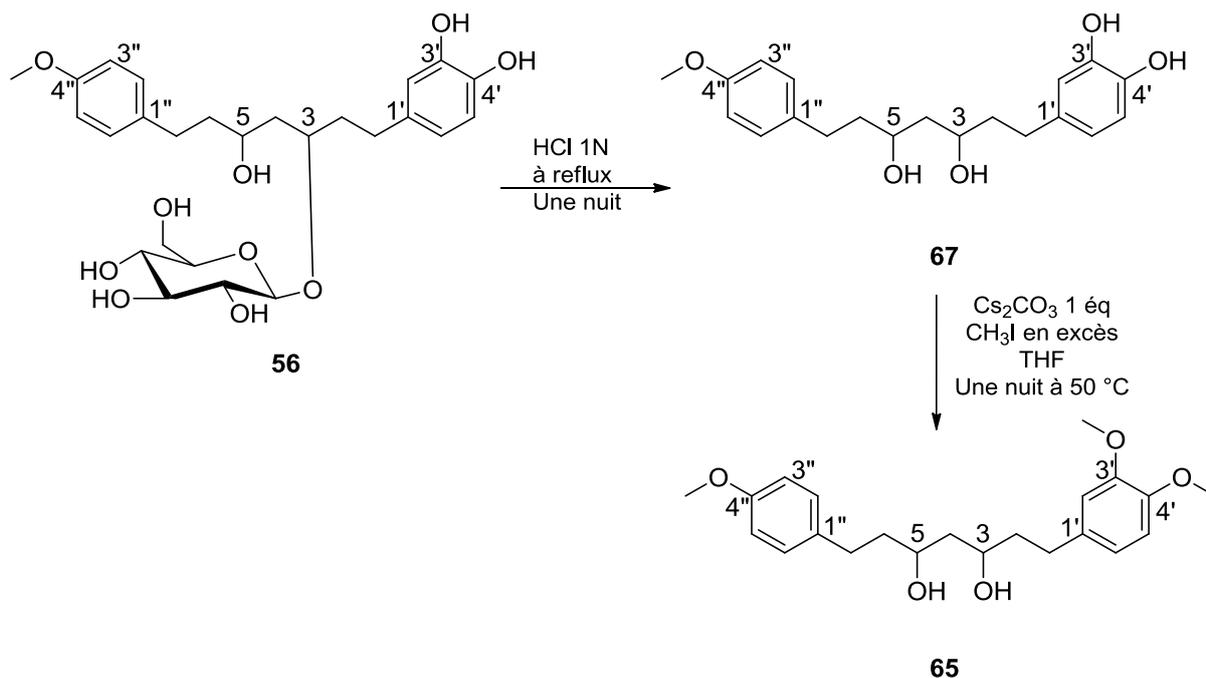


Figure 59. Dérivatisation du composé 3 (56)

2.2.5 Application de l'EC au composé 4 (57)

• Dérivatisation chimique du composé 4 (57)

Le composé 4 (57) subit une hydrolyse acide (composé 68) suivie d'une méthylation (composé 69) et d'une estérification par un chromophore du type *p*-diméthylaminobenzoate pour donner le composé (70) (Figure 60).

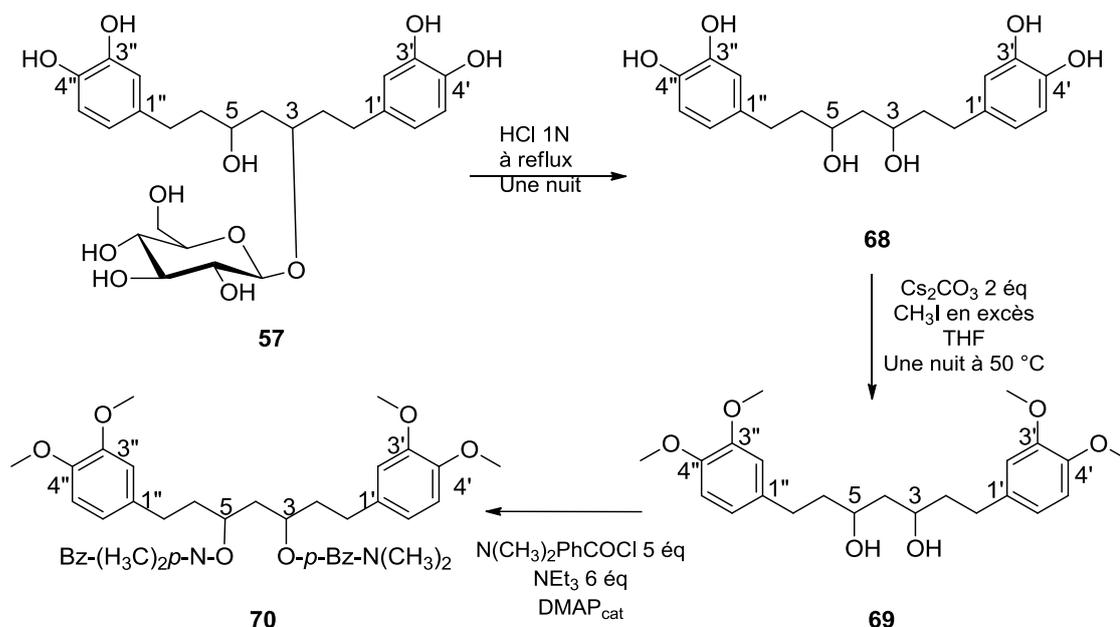
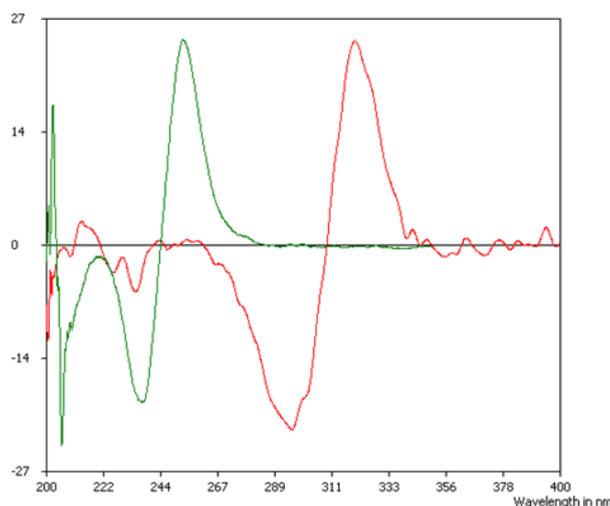


Figure 60. Dérivatisation du composé 4 (57)

- Enregistrement et interprétation du spectre de DC

Le spectre de DC du composé **70** fait apparaître un effet Cotton positif à 319,8 nm suivi d'un effet Cotton négatif à 296 nm (Figure 61) correspondant à une chiralité positive et une stéréochimie similaire à celle de composé **1** (**54**).

Figure 61. Superposition des spectres de DC du composé **70** (en rouge) et du composé **66** (en vert)

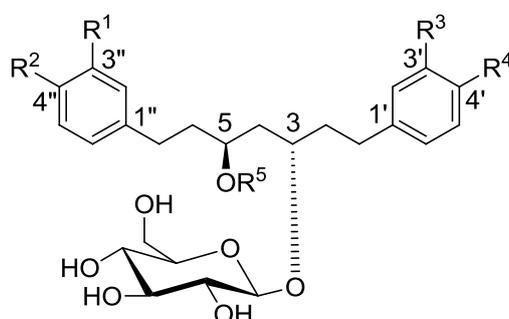
On remarque sur le spectre de DC du composé **70** en rouge (Figure 61), que les effets Cotton obtenus ont subi un déplacement bathochromique par rapport à ceux du composé **66** (en vert). Cet effet est dû à l'utilisation du chromophore *p*-diméthylaminobenzoate. Cela permet d'exploiter une région appelée "red shifted" du spectre, où l'on pourra d'observer sans aucune

ambiguïté les effets Cotton obtenues par l'EC, évitant ainsi les possibilités de superposition d'effets Cotton qui apparaissent dans des régions moins éloignées du spectre.¹²⁷

Enfin, ces éléments nous permettent de dire que le composé 4 (**57**), qui est le (3*S*, 5*S*)-3,5-dihydroxy-1,7-bis(3,4-hydroxyphenyl)-heptyl-3-*O*-β-D-glucopyranoside, est le diastéréoisomère du composé isolé par Yokosuka.¹¹⁵ Rappelons ici que l'on ne peut parler que de diastéréoisomères en raison de la présence du D-glucose pour les deux molécules.

2.2.6 Stéréochimie des composés 5, 6, 7 et 8

Les quantités obtenues pour les composés 5, 6, 7 et 8 ne nous ont pas permis de pratiquer les réactions de dérivatisations indispensables à l'application de l'EC. Étant donné qu'ils possèdent le même signe de pouvoir rotatoire que les composés 1-4, nous leurs avons arbitrairement assigné la même stéréochimie.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Composé 1 (54)	H	OMe	H	OMe	H
Composé 2 (55)	H	OMe	OH	OMe	H
Composé 3 (56)	H	OMe	OH	OH	H
Composé 4 (57)	OH	OH	OH	OH	H
Composé 5 (58)	OH	OMe	H	OMe	H
Composé 6 (59)	OH	OMe	OH	OH	H
Composé 7 (60)	H	OMe	OH	OH	CHO
Composé 8 (61)	OH	OH	OH	OH	CHO

Figure 62. Stéréochimie des composés isolés de *Pyrostria major*

¹²⁷ Yagi, H. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2358-2359.

2.3 Activités biologiques

2.3.1 Activité antiplasmodiale du β -sitostérol

Les 16 fractions issues du fractionnement de l'extrait brut AcOEt des feuilles de *Pyrostris major* ont été soumises à une évaluation antiplasmodiale à la concentration de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les résultats de cette évaluation montrent que la fraction **F.5** est la seule fraction inhibant la croissance du parasite avec 100 % d'inhibition à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tableau III). Curieusement, l'étude phytochimique de la fraction **F.5** a révélé la présence de β -sitostérol (**71**) (Figure 63).

Tableau III. Activité biologique des 16 fractions de *Pyrostris major* sur FcB1 à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fraction	F.1	F.2	F.3	F.4	F.5	F.6	F.7	F.8	F.9	F.10	F.11	F.12	F.13	F.14	F.15	
% d'inhibition	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FcB1 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$																
Fraction	F.16															
% d'inhibition	0															
FcB1 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$																

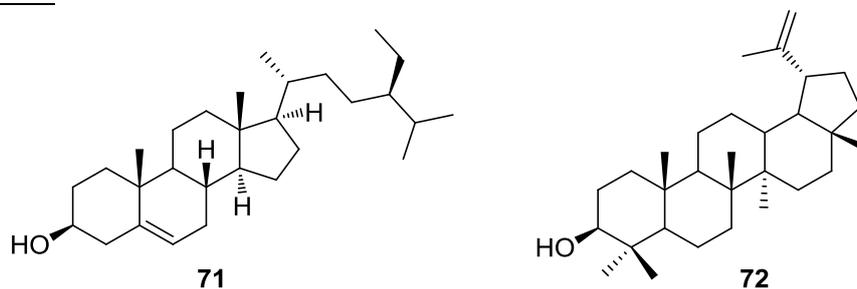


Figure 63. Structures du β -sitostérol (71**) et du lupéol (**72**)**

Lors de cette étude, le β -sitostérol a montré une CI_{50} de l'ordre de $2 \pm 0,9 \mu\text{M}$ sur la souche chloroquino résistante FcB1. Cela nous a conduit à nous intéresser à l'activité antiplasmodiale des triterpènes. Il y a une dizaine d'années, Ziegler et al¹²⁸ avait démontré que le lupéol (**72**) (Figure 63), un triterpène pentacyclique, possédait une activité antiplasmodiale artefactuelle. En effet, lorsque Ziegler a incubé des globules rouges (GR) sains en présence de lupéol, il remarqua la modification de la forme de leurs membranes et la transformation de ces derniers en stomatocytes impropres à l'invasion par des mérozoïtes ou à la culture du *P. falciparum* (Figure 64).

¹²⁸ Ziegler, H. L. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1441-1446.

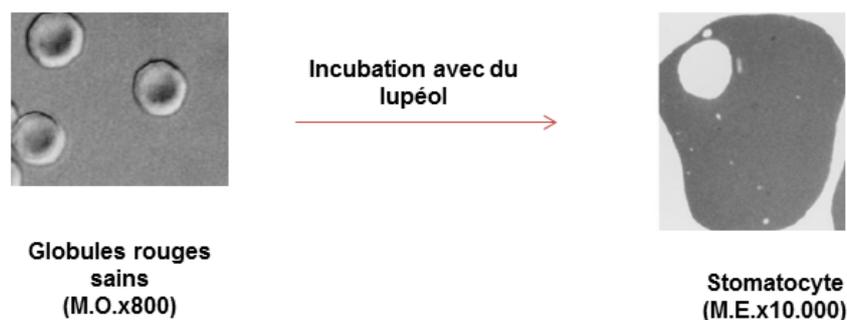


Figure 64. Effet de l'incubation du lupéol sur des globules rouges sains¹²⁸

On sait que certains médicaments amphiphiles ont la capacité d'interagir avec la membrane des GR, c'est le cas de certains neuroleptiques, antipyrétiques et anti inflammatoire non stéroïdien.¹²⁹

En fonction de la nature chimique des composés amphiphiles, les GR seront transformés en stomatocytes ou en échinocytes. En effet, Sheetz¹³⁰ a démontré que les composés anioniques auront tendances à s'imbriquer dans la membrane externe de la bicouche lipidique formant des échinocytes tandis que les composés cationiques auront tendances à pénétrer jusqu'à la membrane interne de la bicouche lipidique conduisant à la formation de stomatocytes (Figure 65)

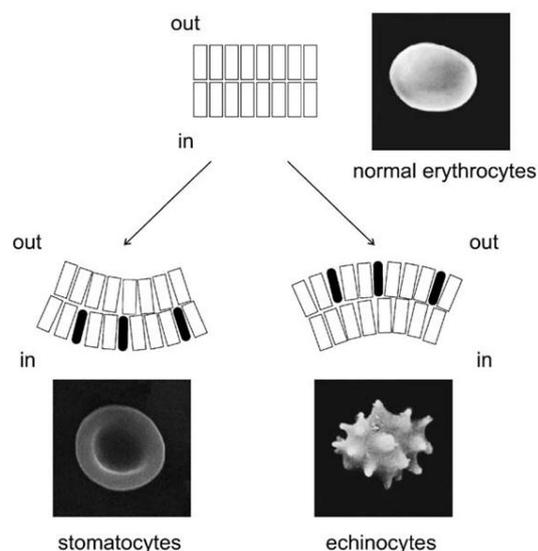


Figure 65. Formation des stomatocytes et des échinocytes¹³¹

¹²⁹ Tatsuzo, F. et al. *Biochem. Pharmacol.* **1979**, 28, 613-620.

¹³⁰ Sheetz, M. P. et al. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, 71, 4457-4461.

¹³¹ Michalak, K. et al. dans: *The Role of the Membrane Actions of Phenothiazines and Flavonoids as Functional Modulators*, **2007**, 223-302

Cette différence de distribution des composés au sein du GR est attribuée aux interactions électrostatiques qu'ils développent à l'égard de la phosphatidylsérine, un phospholipide de charge nette négative localisé au niveau de la face cytoplasmique de la bicouche lipidique.

2.3.2 Activités antiplasmodiale et cytotoxique des diarylheptanoïdes

L'activité biologique de l'ensemble des diarylheptanoïdes glycosylés ainsi que de leurs dérivés a été évaluée vis-à-vis du *P. falciparum* (*in vitro*). En parallèle, la cytotoxicité de ces produits est évaluée sur des lignées cellulaires cancéreuses (KB et HL-60) et saines (MRC-5).

L'ensemble de ces résultats est présenté dans le Tableau IV ci-dessous :

Tableau IV. Activités antiplasmodiale et cytotoxique des composés isolés de *Pyrostria major* et de leurs dérivés

Composés	<i>P. falciparum</i> souche FcB1 ^a	KB ^a	MRC-5 ^a	HL-60 ^a
54	>20	>25	>25	>25
62	>20	>25	>25	>25
63	>20	>25	>25	>25
55	>20	>25	>25	>25
64	>20	>25	>25	>25
65	>20	>25	>25	>25
66	>20	>25	>25	>25
56	>20	>25	>25	>25
67	>20	>25	>25	>25
57	>20	>25	>25	>25
68	>20	>25	>25	>25
69	4,1 ± 0,8	175,5 ± 6,3	>250	140 ± 7
70	4,5 ± 0,2	>25	>25	>25
58	>20	>25	>25	>25
59	>20	>25	>25	>25
60	>20	>25	>25	>25
61	>20	>25	>25	>25
Chloroquine	0,05 ± 0,02	-	-	-
Taxotere	0,005 ± 0,001	0,00016	31,5	0,00046

^a Activité biologique exprimée en $CI_{50} \pm DS \mu M$

A la lecture de ce tableau, on peut émettre plusieurs observations quant à l'activité biologique des diarylheptanoïdes naturels et synthétiques

- La première est la très faible toxicité de ces produits sur lignées cellulaires saines et cancéreuses. Cette observation est en accord avec les conclusions d'Ishida¹³² par rapport au fait que la présence du motif β dicétones conjugués de la curcumine est indispensable à l'activité cytotoxique. A noter que le composé **69** montre une cytotoxicité 10 fois moins importante que son énantiomère obtenu lors des travaux de Yokosuka.¹¹⁵

¹³² Ishida, J. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3481-3487.

- Si l'on considère l'activité antiplasmodiale on observe, sans surprise, que les huit diarylheptanoïdes glycosylés (**54-61**) provenant des fractions inactives **F.15** et **F.16** (Tableau III) n'ont montré aucune activité vis-à-vis du *P. falciparum* à la dose de 20 μM .
- Enfin, parmi les diarylheptanoïdes synthétiques (**62-70**), on notera que seuls les composés **69** et **70** ont montré une activité antiplasmodiale significative. La présence des quatres méthoxy semblent donc importante pour l'activité.

2.3.3 Activités antileishmanienne et antitrypanosomale

Au regard de l'inactivité de la plupart des diarylheptanoïdes naturels et hémisynthétiques, nous avons pensé à évaluer ces derniers vis-à-vis de *Leishmania donovani* (forme amastigote) et de *Trypanosoma brucei* (forme trypomastigote). En effet, des études plus ou moins récentes soulignent l'activité de certains arylheptanoïdes sur *L. donovani* et *T. brucei*.^{99, 133}

Les résultats biologiques obtenus sur ces parasites sont résumés dans le Tableau V.

Tableau V. Activités antileishmanienne et trypanosomale des composés isolés de *Pyrostria major* et de leurs dérivés

Composés	<i>L. donovani</i> intramacrophage amastigotes CI ₅₀ (μM) \pm SD	<i>T. brucei</i> CEM ^a (μM)
54	39,7 \pm 3,2	>100
62	53,0 \pm 4,2	>100
63	35,0 \pm 2,8	>100
55	31,2 \pm 2,5	>100
64	37,4 \pm 2,9	50
65	66,8 \pm 5,3	50
66	10,5\pm0,8	25
56	33,2 \pm 2,6	>100
67	58,5 \pm 4,7	25
57	33,3 \pm 2,6	25
68	67,5 \pm 5,4	50
69	>100	50
70	26,1 \pm 2,0	>100
58	41,4 \pm 3,3	>100
59	>100	12,5
60	33,0 \pm 2,6	25
61	34,6 \pm 2,7	25
Pentamidine	11,2 \pm 1,3	3,1
Amphotericin B	0,10 \pm 0,02	-

^aMEC : Concentration effectrice minimale

Dans ce tableau, on remarque que deux composés ont montré des activités significatives sur les deux parasites.

¹³³ Rasmussen, H. B. et al. *Planta. Med.* **2000**, *66*, 396-398.

- Le composé hémisynthétique **66** a montré une bonne activité sur la forme amastigote de *Leishmania donovani*.
- Le composé naturel **59** a montré une activité antitrypanosomale comparable à celle de la référence (Pentamidine).

En conclusion, les diarylheptanoïdes glycosylés et leurs dérivés ont montré une faible activité antiparasitaire et cytotoxique à l'exception ; des composés **69** et **70** vis-à-vis du *P. falciparum*, du composé **66** vis-à-vis de la forme amastigote de *L. donovani* et du composé **59** qui a montré une activité antitrypanosomale significative.

Le composé **69**, du fait de son indice de sélectivité remarquable (IS=70) et de sa simplicité structurale, constitue un châssis moléculaire prometteur pour la préparation d'analogues antiplasmodiaux.

Les activités des composés **66** et **59** obtenues lors de ces essais *in vitro*, pourraient justifier d'éventuelles études *in vivo*.

3-Conclusion de la Partie II

L'étude phytochimique des feuilles de *Pyrostria major* a conduit à l'isolement de huit nouveaux diarylheptanoïdes glycosylés (**54-61**), décrits pour la première fois dans une plante appartenant à la famille des Rubiaceae.

L'activité antiplasmodiale de l'extrait AcOEt des feuilles est probablement due à la présence du β sitostérol. Cette activité serait due à l'effet stomatocytogénique provoqué par cette famille de composés. Bien entendu, seule une observation au microscope électronique à transmission pourrait valider cette hypothèse.

L'utilisation de l'"Exciton chirality" a permis de déterminer la configuration absolue des diarylheptanoïdes glycosylés isolés. Cette étude structurale nous a permis d'obtenir d'une part, deux composés (**69-70**) antiplasmodiaux sélectifs et non cytotoxiques et d'autre part, un composé antileishmanien et un autre antitrypanosomal (**66** et **59**, respectivement). Des études de chimie médicinale pourraient être envisagées à partir de ces "hits" avec l'objectif de trouver des molécules très actives sur les différents protozoaires et dont le coût de fabrication soit raisonnable.

Troisième partie
**III- *Gonioma malagasy* : Études
chimique et biologique**

1-Étude bibliographique

1.1 Famille des Apocynaceae

Les Apocynaceae forment une famille de plantes dicotylédones comprenant, selon la classification traditionnelle, plus de 5031 espèces réparties en 402 genres.¹³⁴ Elle regroupe des arbres, arbustes, des lianes et plus exceptionnellement des espèces cactiformes ou des herbes vivaces.¹³⁵ Elle fut décrite pour la première fois en 1789 par Antoine-Laurent de Jussieu.

1.1.1 Classification des Apocynaceae

Comme les Rubiaceae, les Apocynaceae appartiennent à l'ordre des Gentianales qui renferme 5 familles : Les Apocynaceae, les Gelsemiaceae, les Gentianaceae, les Loganiaceae et les Rubiaceae (voir Annexe 1). La phylogénie de cette famille a récemment été remaniée. En effet, la dernière classification APG (Angiosperms Phylogeny Groups) a annexé la famille des Asclepiadaceae aux Apocynaceae¹³⁶ afin d'en faire une famille monophylétique.

Une classification plus récente, basée sur le système de classification APG II, organise les Apocynaceae en 5 sous-familles :¹³⁷

- Les Rauvolfioideae
- Les Apocynoideae
- Les Periplocoideae
- Les Secamonoideae
- Les Asclepiadoideae

1.1.2 Répartition géographique

La plupart des individus de la famille des Apocynaceae se trouvent dans les régions tropicales et subtropicales, mais quelques genres s'étendent aux régions tempérées (Figure 66).

¹³⁴ <http://www.theplantlist.org/browse/A/Apocynaceae/>, 11/08/2012

¹³⁵ Judd, W. S. et al. dans: *Botanique systématique*, 2002, 366.

¹³⁶ APG. *Bot. J. Linn. Soc.* 2009, 161, 105-121.

¹³⁷ Endress, M. et al. *The Botanical Review* 2000, 66, 1-56.

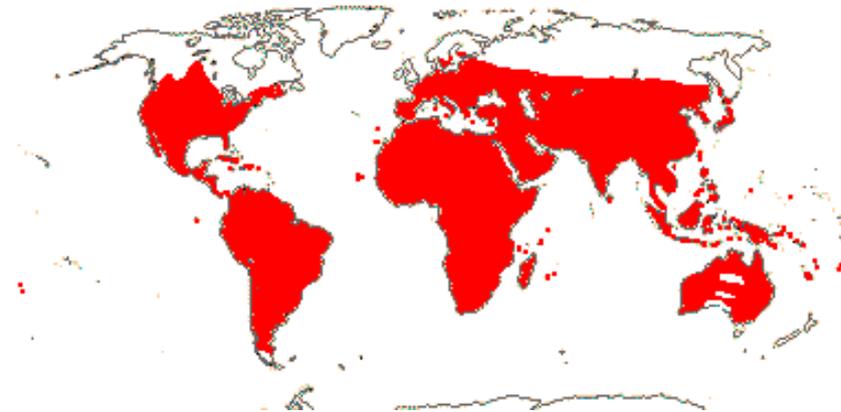


Figure 66. Répartition géographique des Apocynaceae⁷⁹

1.1.3 Critères de reconnaissance

Cette vaste famille présente certains caractères communs à la grande majorité des individus :¹³⁸

- Des feuilles souvent opposées ou verticillées, à nervation pennée.
- Un appareil sécréteur à latex et la présence d'un phloème interne.
- Des fleurs groupées en cymes.
- Des inflorescences déterminées, parfois réduites à une fleur solitaire, terminales ou axillaires.
- Des fruits souvent géminés formant une baie ou une drupe.

¹³⁸ Dupont, F. F. et al. dans: *Botanique, les familles de plantes*, 2012, 227.

1.2 Le genre *Gonioma* et l'espèce *malagasy*

1.2.1 Description botanique

1.2.1.1 Le genre *Gonioma*

Le genre *Gonioma* est un genre d'Apocynacées-Plumériées, appartenant à la sous-famille des Rauvolfioïdées, représenté par 2 espèces :

- l'espèce *kamassi* (E. Meyer) d'Afrique méridionale (région orientale du Cap de Bonne Espérance).¹³⁹
- l'espèce *malagasy* découverte dans le Sud-Ouest de Madagascar par Markgraf et Boiteau.¹⁴⁰

L'espèce *kamassi*, contrairement à l'espèce *malagasy*, est un arbuste glabre, dont les fleurs se distinguent par l'absence de disque et des anthères apiculées. Le fruit est formé de deux follicules et les feuilles sont opposées ou verticillées. Les fleurs, jaunâtres et de petite taille, sont disposées en cymes denses et corymbiformes.¹⁴¹

1.2.1.2 L'espèce *Gonioma malagasy*

Gonioma malagasy Markgraf & Boiteau est un grand arbre qui peut atteindre 30 mètres de hauteur (Figure 68).

- **Feuilles** : Elles sont tardives caduques, coriaces, opposées ou verticillées par 3. Le pétiole long de 4-10 mm. Le limbe est lancéolé, un peu luisant au-dessus. (Figure 69)
- **Inflorescences** : Elles sont en corymbes, à sépales glabres, droits. Les anthères sont largement ovales, obtuses.
- **Fruits** : Ils possèdent des méricarpes arqués sur le dos, longs de 6-11 cm et de 0,6 cm de diamètre.
- **Graines** : Elles font 2,4 à 4 cm de longueur du côté de l'acumen, 2 cm de longueur sur l'autre côté.

¹³⁹ Meyer, E. H. F. *Comm. Pl. Afr. Austr.* **1837**, 188,

¹⁴⁰ Markgraf, F., Boiteau, P. *Adansonia* **1972**, 12, 223-229.

¹⁴¹ http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/O_BAI_Dict_Bot_2/BAI_Dict_Bot_2_729.pdf, **11/06/2012**

F. MARKGRAF — APOCYNACEÆ



PL. 16. — *Gonioma malagasy* Markgr. & Boiteau : 1, rameau florifère $\times 2/3$; 2, stipules intrapétiolaires $\times 5$; 3, corolle étalée $\times 7$; 4, calice et gynécée $\times 10$; 5, ovaire et disque; 6, fruit $\times 2/3$; 7, graine $\times 1,5$.

Figure 67. Planche botanique des parties de *Gonioma malagasy*¹⁴⁰



Figure 68. Photo de l'arbre *Gonioma malagasy*–Photo : IMRA®



Figure 69. Photo des feuilles de *Gonioma malagasy*–Photo : IMRA®

1.2 2 Répartition géographique

Comme il a été évoqué précédemment, les deux espèces du genre *Gonioma* ne se trouvent qu'à Madagascar et en Afrique du Sud.

Gonioma malagasy est endémique de Madagascar. On la retrouve à l'Ouest sur les plateaux de Bara vers 300 mètres d'altitude, ainsi que dans le Sud dans la région de Sakaraha dans la forêt de Zombitsy, aux confins des bassins du Fiherenana et de l'Onilahy (Figure 70).



Figure 70. Localisation géographique de *G. malagasy* (point jaune) et de *G. kamassi* (point rouge) ¹⁴²

1.2.3 Utilisations traditionnelles

Le bois de *Gonioma malagasy* représente un excellent bois de tabletterie. En revanche, même si Boiteau¹⁴⁰ a décrit les écorces comme étant toxiques, les ethnies Sud de Madagascar utiliseraient les écorces broyées pour traiter ce qu'elles appellent le "BAY" externe, et la décoction pour traiter le "BAY" interne et les maux de ventres quotidiens. D'après la culture des ethnies sud malgaches, le mot "BAY" a plusieurs significations. Il peut signifier : furoncles mais également inflammation et même cancer.¹⁴³

¹⁴² http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map&r=.125&la=-19.5&lo=45&kind=Gonioma, 11/06/2012

¹⁴³ Philippe Rasoanaivo, Communication personnelle.

1.3 Composition chimique du genre *Gonioma*

Le genre *Gonioma* a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques dans les années 60 et 80. Les travaux ont conduit à la mise en évidence d'alcaloïdes indolomonoterpéniques dont certains présentent des structures chimiques originales.

1.3.1 Alcaloïdes de l'espèce *G. kamassi*

Cette espèce a fait l'objet de deux études phytochimiques dans les années 60. On citera parmi les alcaloïdes isolés de *G. kamassi* (Figure 71) :

- La fluorocarpamine (**73**), isolée pour la première fois des écorces de *Gonioma kamassi*.¹⁴⁴
- L'indolopyridicoline (**74**), de structure originale, retrouvée uniquement dans cette espèce de *Gonioma*.¹⁴⁴
- La (+)-aspidospermidine (**75**), la (-)-quebrachamine (**76**) et la (-)-rhazidine (**77**)^{145,146} qui sont des alcaloïdes que l'on retrouve communément chez les Apocynaceae.

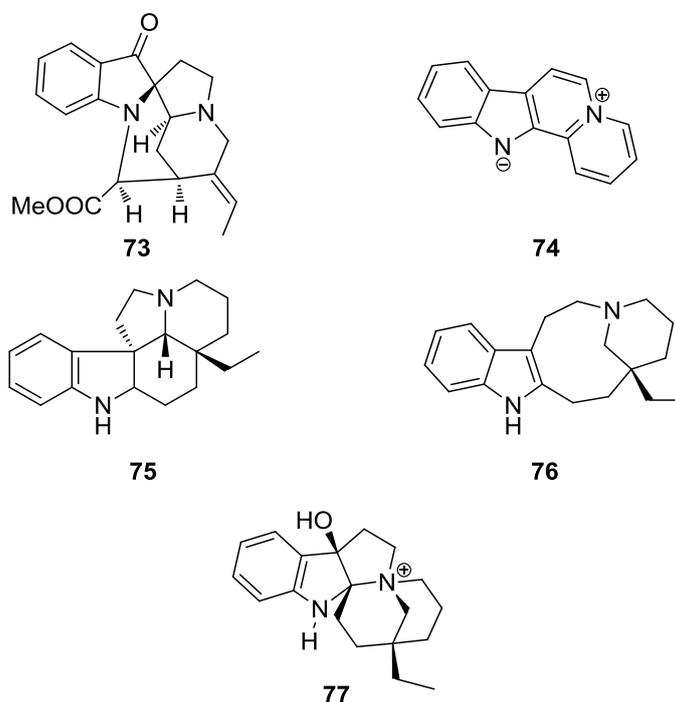


Figure 71. Structures d'alcaloïdes isolés de *G. kamassi*

¹⁴⁴ Kaschnitz, R. et al. *Monatsh. Chem.* **1965**, *96*, 909-921.

¹⁴⁵ Spittler-Friedmann, M. et al. *Monatsh. Chem.* **1964**, *95*, 1228-1233.

¹⁴⁶ La stéréochimie de la (-)-rhazidine a été déduite par rapport à celle de la (+)-rhazidine qui a été hémisynthétisée. (voir Elès et al.¹⁸⁴)

1.3.2 Alcaloïdes de l'espèce *G. malagasy*

Cette espèce, de découverte plus récente, a quant à elle fait l'objet de trois études phytochimiques dans les années 80. On notera l'isolement d'alcaloïdes indolomonoterpéniques de structure originale (Figure 72) tels que la goniomine (**78**),¹⁴⁷ la (-)-goniomitine (**79**)¹⁴⁸ et la pleiomutinine (**80**).¹⁴⁹

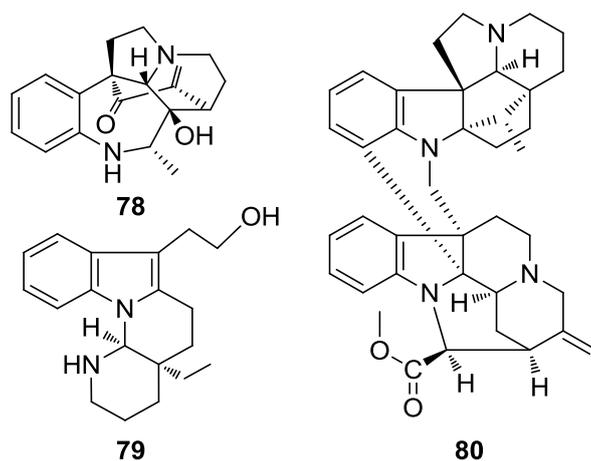


Figure 72. Structures d'alcaloïdes isolés de *G. malagasy*

1.3.2.1 La goniomine

D'un point de vue structural, la goniomine (**78**) constitue un nouveau type d'alcaloïde dérivé du système tetrahydro-1H-1-benzazépine. Une voie biosynthétique (Figure 73) a été proposée pour cette molécule, en prenant comme point de départ la precondylocarpine (**81**). En effet, l'ouverture intramoléculaire de l'époxyde suite à l'attaque de l'amine primaire formée à l'issue du clivage de l'imine (**83**) permettrait d'expliquer la formation de la goniomine. Il est à noter que ce type de coupure se retrouve dans les voies biogénétiques de la quinine (**1**) et la camptothécine (**85**) qui ont pour précurseur commun la strictosidine (**84**) (Figure 74).

¹⁴⁷ Chiaroni, A. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5920-5921.

¹⁴⁸ Randriambola, L. et al. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2123-2126.

¹⁴⁹ Rasoanaivo, P. et al. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 376-378.

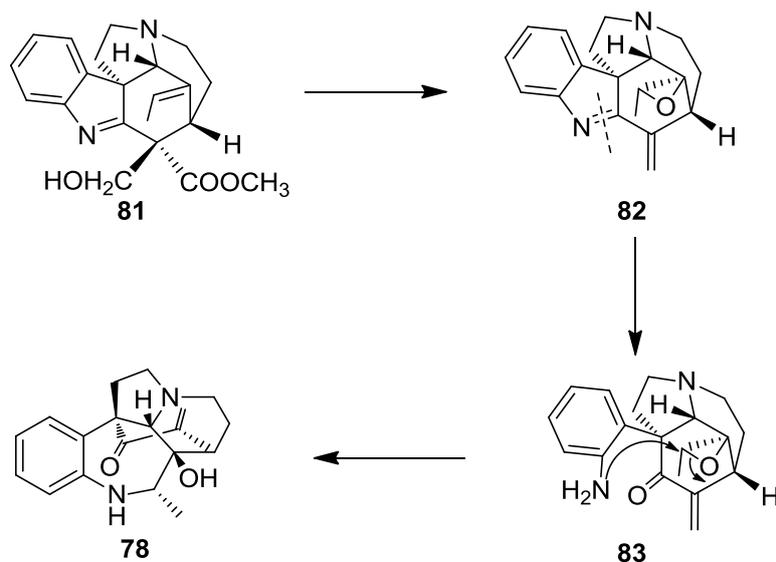


Figure 73. Hypothèse biosynthétique de la goniimine (78)¹⁴⁷

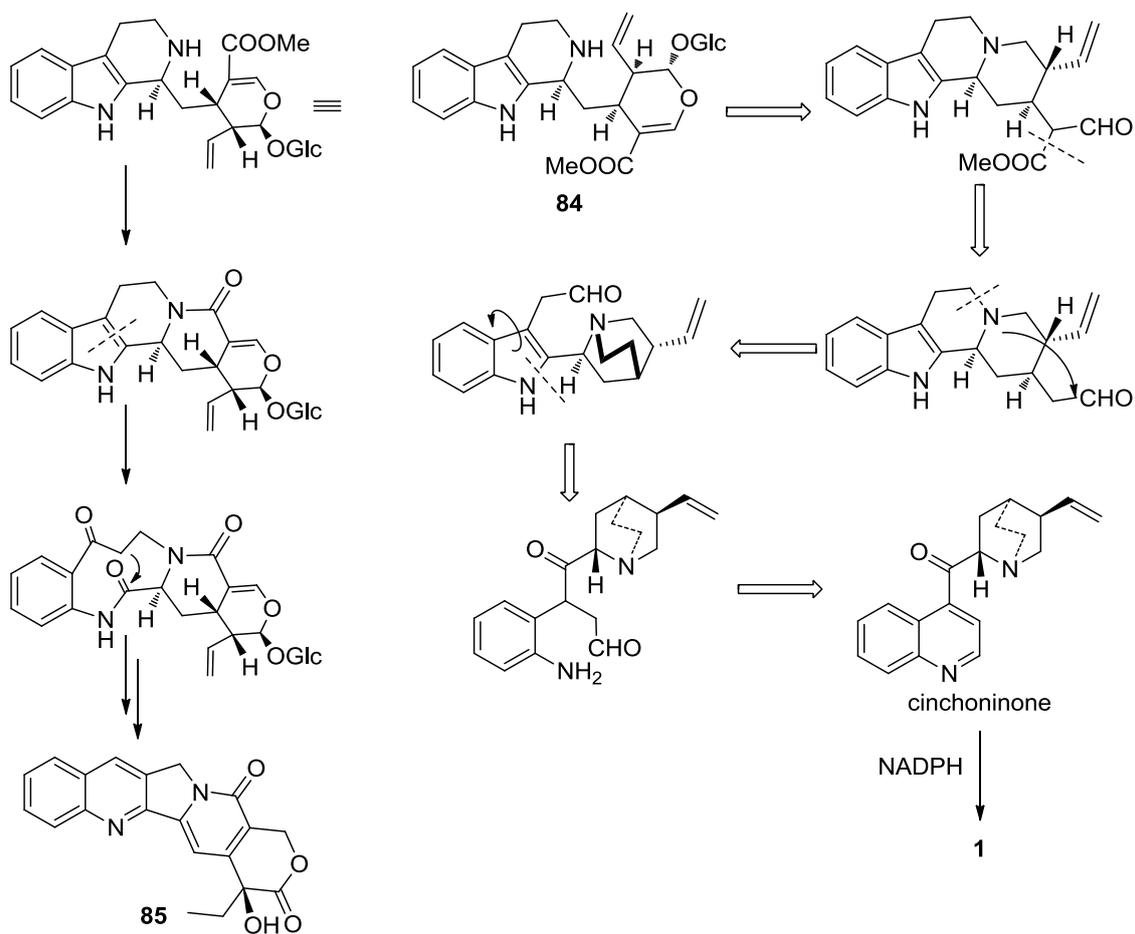


Figure 74. Hypothèse biosynthétique de la quinine (1) et de la camptothécine (85)¹⁵⁰

1.3.2.2 La goniomitine

La goniomitine (**79**) a été isolée par Husson et al.¹⁴⁸ des racines de *G. malagasy*. Sa structure chimique unique dans la nature¹⁵¹ a attiré l'attention de nombreuses équipes dans le but de réaliser sa synthèse totale.¹⁵¹⁻¹⁵²⁻¹⁵³⁻¹⁵⁴ Les travaux de Takano ont permis de corriger la stéréochimie absolue proposée initialement par Husson.

Une voie biosynthétique (Figure 75) a été proposée pour cette molécule, en prenant comme point de départ la vincadifformine (**86**).

La goniomitine a montré une activité cytotoxique submicromolaire sur des lignées cellulaires cancéreuses telles que : A-549, MCF-7 et PC-3M. Par ailleurs, il est intéressant de noter que contrairement au taxol et à la vinblastine, la goniomitine a conservé le même ordre d'activité sur des lignées cellulaires surexprimant la P-gp tel que MDR-1-MCDK.¹⁵¹

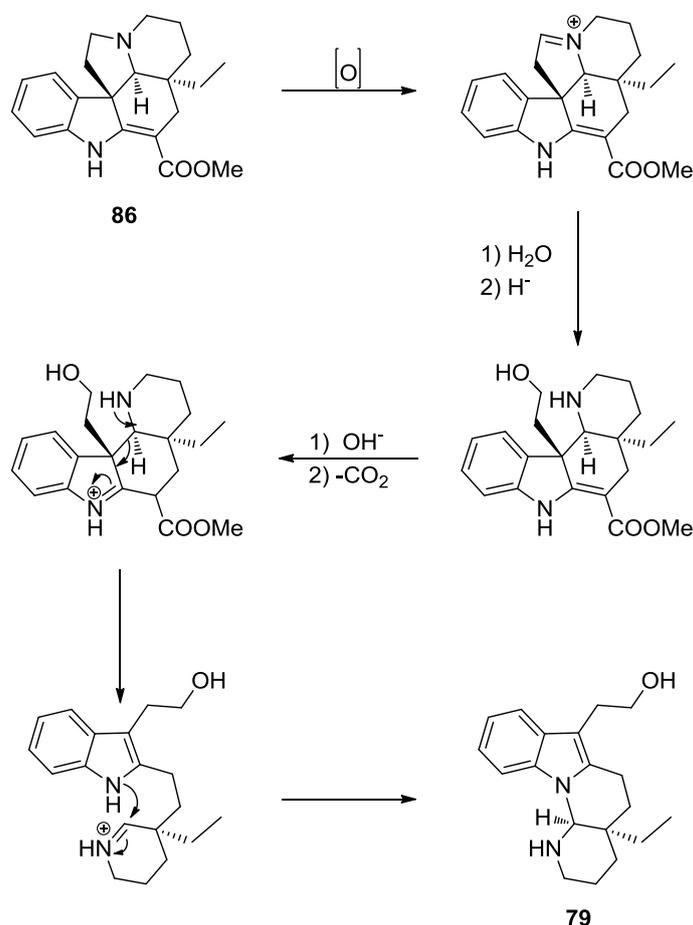


Figure 75. Hypothèse biosynthétique de la (-)-goniomitine (**79**)¹⁴⁸

¹⁵¹ De Simone, F. et al. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5767-5770.

¹⁵² Takano, S. et al. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1991**, 462-464.

¹⁵³ Mizutani, M. et al. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1796-1799.

¹⁵⁴ Morales, C. L. et al. *Org. Lett.* **2007**, *10*, 157-159.

1.3.2.3 La pleiomutinine

La pleiomutinine (**80**) a été isolée des feuilles de *G. malagasy*.¹⁴⁹ A l'issue de cette étude, l'ancienne structure chimique de la 14',15'-dihydropycnanthine a été révisée pour finalement être attribuée à celle de la pleiomutinine. Par ailleurs, il faut noter qu'elle a également été isolée de *Hunteria zeylanica*¹⁵⁵ et de *Pleiocarpa mutica*.¹⁵⁶

Enfin, une activité antiplasmodiale significative a été décrite pour ce composé à l'issue d'une enquête ethnopharmacologique effectuée au Ghana.¹⁵⁶

1.4 Bisindoles à pont méthylène

A l'issue de l'étude phytochimique de *G. malagasy*, nous avons isolé une série d'alcaloïdes bisindoliques présentant un pont méthylène comme dans le cas de la pleiomutinine (**80**). Il se trouve que l'origine biosynthétique de ce méthylène est controversée. Pour cette raison, nous avons choisi de dresser une rétrospective, extraite de la littérature, traitant de la répartition de ces composés au sein des plantes supérieures, de leurs activités biologiques et de leurs biosynthèses en précisant, lorsque cela est possible, l'origine du méthylène liant les deux unités indoliques.

L'organisation de cette partie suivra la classification proposée par Kam et Choo,¹⁵⁷ basée sur le type structural des monomères constitutifs.

1.4.1 Indole-Indole et apparentés

1.4.1.1 Alcaloïdes du genre *Murraya*

On retrouve parmi les alcaloïdes du genre *Murraya* (famille des Rutaceae) des composés biscarbazoles reliés par un pont méthylène. Il s'agit notamment de la bismurrayafoline A¹⁵⁸ (**88**) qui serait, d'après Knölker,¹⁵⁹ le produit du couplage oxydatif de la murrayafoline A (**87**) (Figure 76).

Il faut noter que la bismurrayafoline A a montré une cytotoxicité modeste sur les lignées cellulaires cancéreuse HOP-92 et LOX IMVI.¹⁶⁰

¹⁵⁵ Lavaud, C. et al. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 445-447.

¹⁵⁶ Addae-Kyereme, J. et al. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 99-103.

¹⁵⁷ Kam, T.-S. et al. dans: *Chapter 4 Bisindole Alkaloids*, **2006**, 181-337

¹⁵⁸ Furukawa, H. et al. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 4202-4205.

¹⁵⁹ Knölker, H.-J. et al. dans: *Chapter 3 Biogenesis of Carbazole Alkaloids*, **2008**, 159-180

¹⁶⁰ Itoigawa, M. et al. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 893-897.

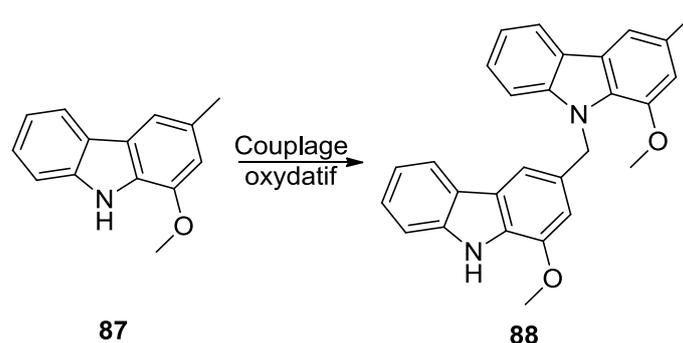


Figure 76. Hypothèse biosynthétique de la bismurrayafoline A (88)

1.4.1.2 Alcaloïdes du genre *Arundo*

Plusieurs bisindoles ont été isolés d'*Arundo donax*, une espèce de plante herbacée de la famille des Poaceae. Le plus simple d'entre eux est l'arundine (89) (Figure 77).¹⁶¹

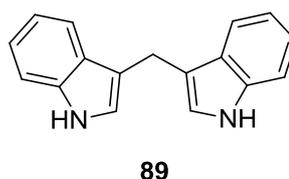


Figure 77. Structure de l'arundine (89)

Veluri a isolé cette même molécule à partir de la bactérie marine *Vibrio parahaemolyticus*. Il proposa pour sa biosynthèse, une dimérisation des deux unités indoliques en présence d'une molécule de formaldéhyde.¹⁶²

Dernièrement, une équipe américaine a démontré que le 3,3'-diindolylmethane (l'arundine) serait capable d'inactiver le NF- κ B contribuant à potentialiser l'activité du taxotere lors du cancer du sein.¹⁶³

¹⁶¹ Khuzhaev, B. et al. *Chem. Nat. Compd.* **1994**, *30*, 635-636.

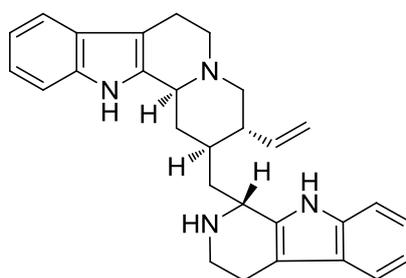
¹⁶² Veluri, R. et al. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1520-1523.

¹⁶³ Rahman, K. W. et al. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 2757-2765.

1.4.2 Corynane-Tryptamine

Les alcaloïdes de ce groupe se retrouvent principalement chez les plantes du genre *Strychnos*. Néanmoins, il arrive que certains d'entre eux soient isolés d'autres genres appartenant aux Apocynaceae, aux Rubiaceae ou même aux Loganiaceae.

L'étude phytochimique des feuilles et des racines de *Cinchona ledgeriana*, a conduit à l'isolement de la cynchophilline (90),¹⁶⁴ un alcaloïde constitué d'une unité corynane et d'une unité tryptamine (Figure 78).



90

Figure 78. Structure de la cynchophilline (90)

L'hypothèse biosynthétique de la cynchophilline (90)¹⁶⁵ (Figure 79) permet d'expliquer l'origine du pont méthylène existant entre les deux monomères. En effet, il s'agit du méthylène résiduel de la corynantheale (91) (provenant de la strictosidine (84)) qui forme la base de Schiff (93) avec la tryptamine (92).

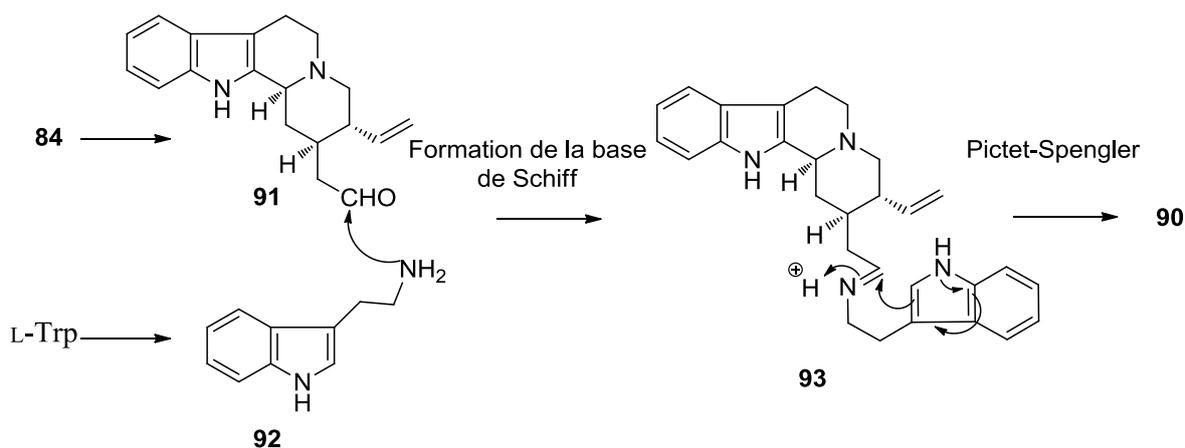


Figure 79. Hypothèse biosynthétique de la cynchophilline (90)

¹⁶⁴ Cordell, G. A. et al. dans: *Chapter 1 Bisindole Alkaloids*, 1982, 1-295

¹⁶⁵ Aerts, R. J. et al. *Planta* 1991, 183, 536-541.

D'un point de vue biologique, du fait de l'analogie structurale de la cynchophilline et de l'évétine, il n'est pas surprenant de retrouver une activité anti-amibienne associée. En effet, la cynchophilline a montré une très forte activité *in vitro* sur *Entamoeba histolytica*. En revanche, elle s'est montrée beaucoup moins efficace sur le *Plasmodium falciparum*.¹⁵⁷

1.4.3 Vobasine-Vobasine

L'étude phytochimique de la plante japonaise *Gardneria multiflora* (Loganiaceae) a permis l'isolement et la caractérisation de la gardmultine (**94**) (Figure 80).¹⁶⁶

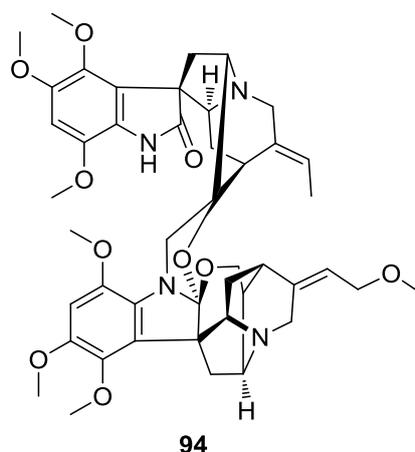


Figure 80. Structure de la gardmultine (**94**)

D'un point de vue biosynthétique (Figure 81), cet alcaloïde résulterait de la fusion de la chitosénine (**95**) et de la gardneramine (**96**) aboutissant à la formation d'un spirocycle à 5 chaînons.¹⁶⁴

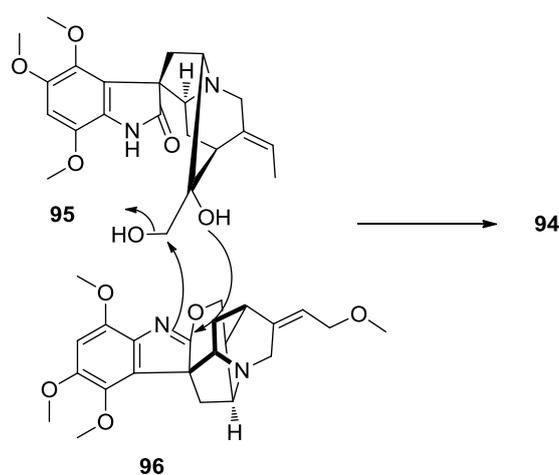


Figure 81. Hypothèse biosynthétique de la gardmultine (**94**)

¹⁶⁶ Sakai, S. et al. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 719-722.

1.4.4 Alcaloïdes du genre *Alstonia*

Les plantes du genre *Alstonia* représentent une source abondante d'alcaloïdes bisindoliques. Ils sont caractérisés par la présence du squelette macroline. Parmi ces alcaloïdes on peut citer la villalstonine (97) (Figure 82), isolée d'*Alstonia mulleriana* (Apocynaceae) par Elderfield. Sa structure a été établie par Nordman en 1965.¹⁶⁷

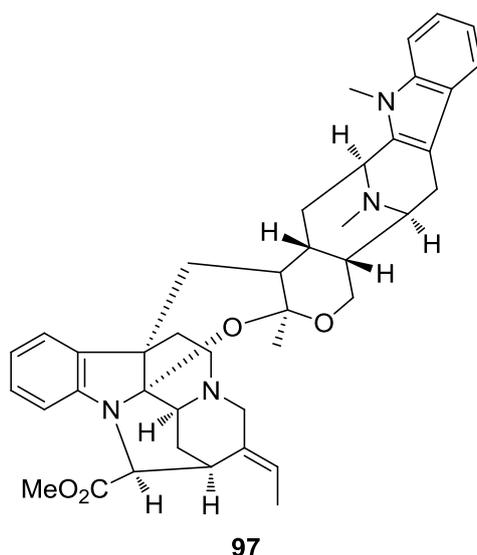


Figure 82. Structure de la villalstonine (97)

D'après Scott, cet alcaloïde résulterait de la fusion de la (+)-pleiocarpamine (98) et de la (+)-macroline (99) selon le mécanisme illustré dans la (Figure 83).¹⁶⁸

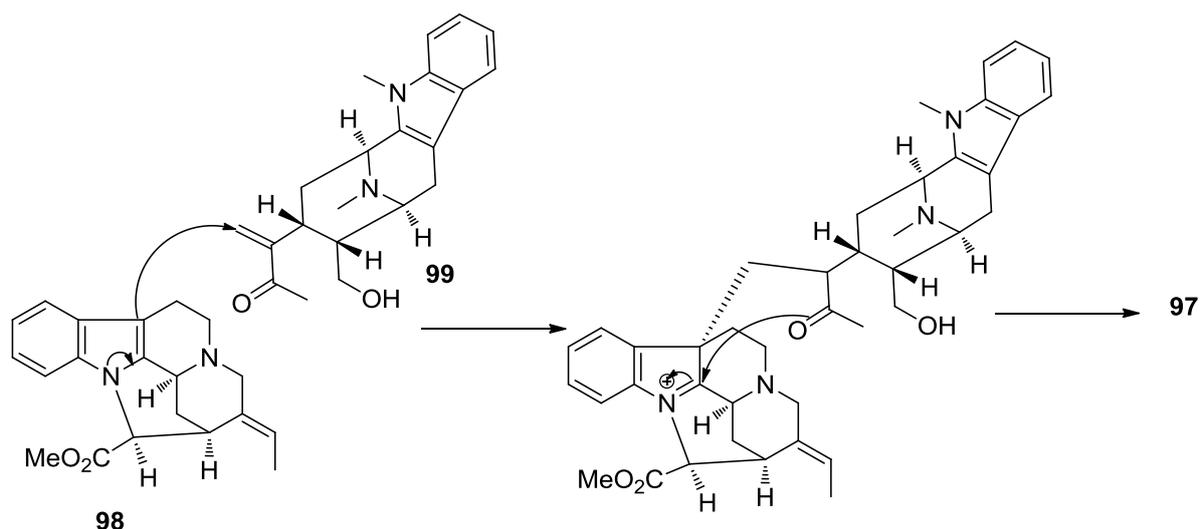


Figure 83. Hypothèse biosynthétique de la villalstonine (97)

¹⁶⁷ Nordman, C. E. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2059-2060.

¹⁶⁸ Scott, A. I. *Bioorg. Chem.* **1974**, *3*, 398-429.

Il est intéressant de noter que la villalstonine (97) a montré une activité antiplasmodiale de l'ordre du nanomolaire sur la souche chloroquino-résistante K1.¹⁶⁹

1.4.5 Ajmaline-Ajmaline

L'investigation chimique des feuilles de *Rauwolfia reflexa* a conduit à l'isolement et à la caractérisation de la raureflexine (100).¹⁷⁰ Cet alcaloïde est constitué de deux monomères de rauflexine (101) liés par un pont méthylène. (Figure 84). A notre connaissance, il n'y a pas eu d'hypothèse biosynthétique proposée pour la raureflexine.

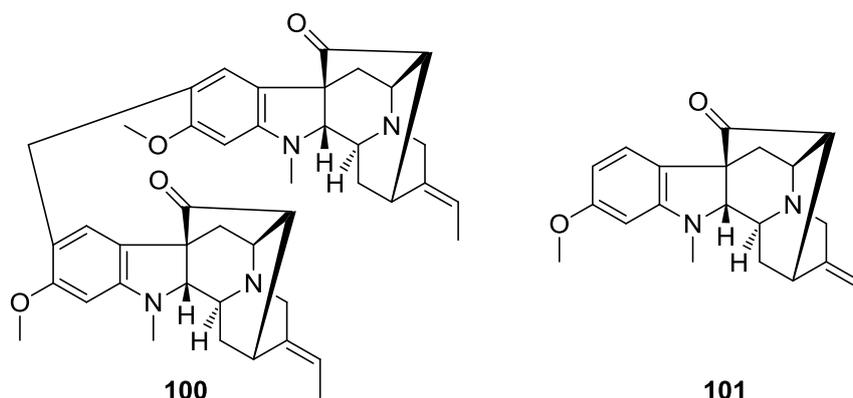


Figure 84. Structures de la raureflexine (100) et de la rauflexine (101)

1.4.6 Strychnane-Strychnane

La bisleucocurine A (102) est un alcaloïde bisindolique présentant un squelette constitué de deux unités strychnane dipontées (Figure 85). Ce composé a été isolé des feuilles de *Leuconotis griffithii* (Apocynaceae).¹⁷¹

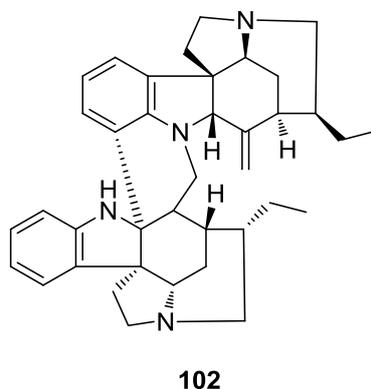


Figure 85. Structure de la bisleucocurine A (102)

¹⁶⁹ Frederich, M. et al. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *102*, 11-19.

¹⁷⁰ Chatterjee, A. et al. *J. Indian Chem. Soc.* **1998**, *75*, 695.

¹⁷¹ Nugroho, A. E. et al. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2589-2592.

La biogénèse de la bisleucocurine A (**102**) débute par un couplage intermoléculaire entre l'aldéhyde 18-deoxy-Wieland-Gumlich (**103**)¹⁷² et l'anhydropereirine (**104**) pour former l'énamine (**105**). Par la suite, l'imine (**106**) subirait une attaque nucléophile du cycle benzénique pour former le deuxième pont (Figure 86).

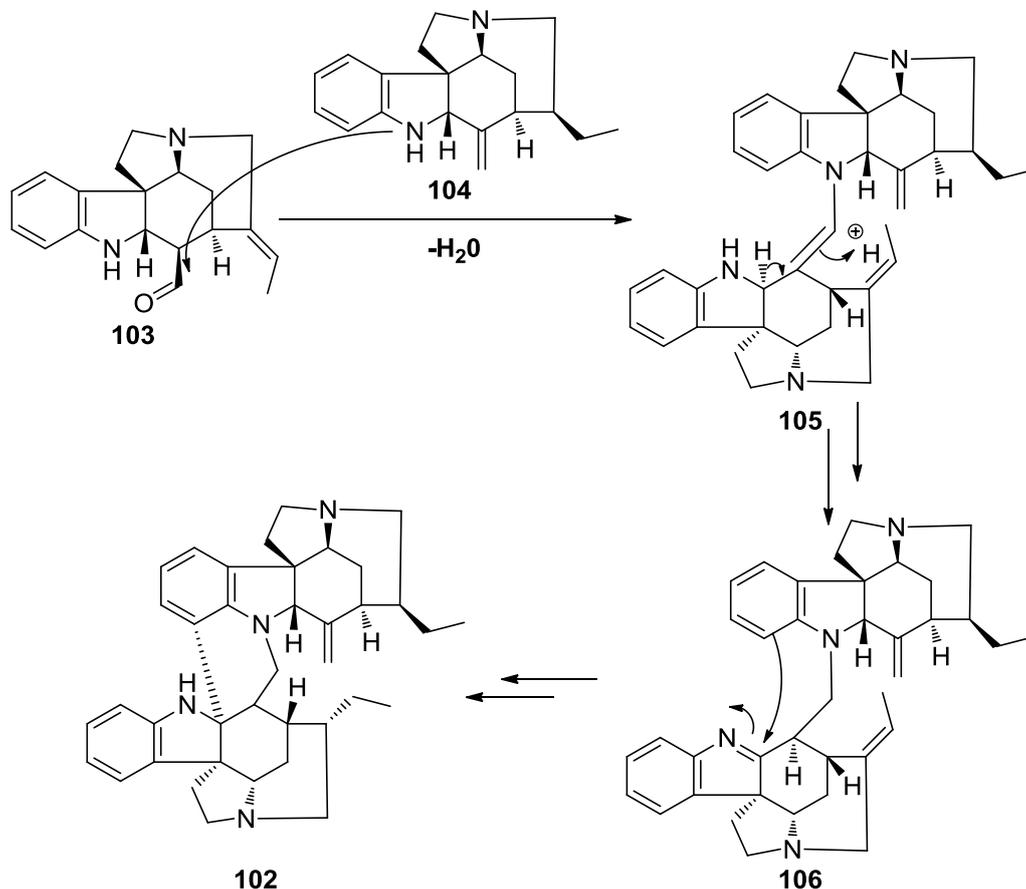


Figure 86. Hypothèse biosynthétique de la bisleucocurine A (**102**)

Enfin, il faut noter que la bisleucocurarine A a montré une activité cytotoxique de l'ordre du micromolaire vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses HL-60, HCT-116 et MCF-7.

1.4.7 Apparicine-Vobasine

Il s'agit ici de la monogagine (**107**) (Figure 87), un alcaloïde bisindolique minoritaire isolé de *Tabernaemontana chippii* et *T. dichotoma*.¹⁷³

¹⁷² Cet aldéhyde est un dérivé de la strychnine. Il a été synthétisé pour la première fois par Walter Gumlich et Koozoo Kaziro travaillant tous les deux dans le laboratoire de Heinrich Wieland.

¹⁷³ Van Beek, T. A. et al. *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 400-423.

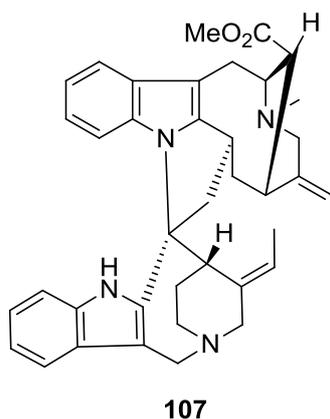


Figure 87. Structures de la monogagine (107)

Cet alcaloïde résulterait d'un couplage intermoléculaire entre l'apparicine (108) et le vobasinol (109). (Figure 88).

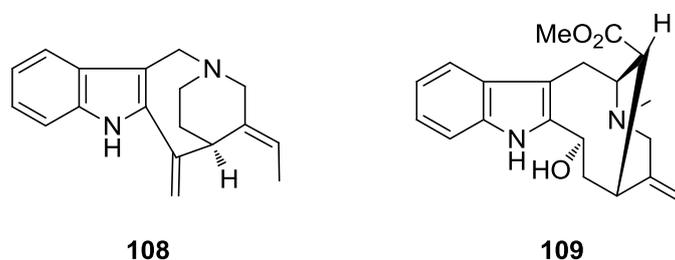


Figure 88. Structures de l'apparicine (108) et du vobasinol (109)

1.4.8 Aspidospermane-Pleiocarpamine

Nous parlerons ici de la pycnanthine (110) (Figure 89), un alcaloïde bisindolique isolé de *Pleiocarpa pycnantha* et constitué d'une unité (+)-pleiocarpamine et (-)-déhydroaspidospermidine.¹⁷⁴

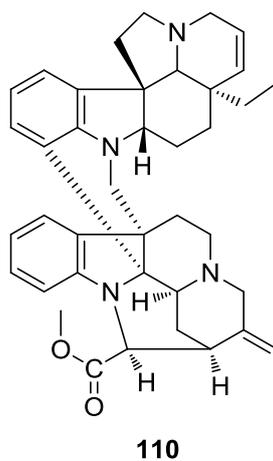


Figure 89. Structure de la pycnanthine (110)

¹⁷⁴ Gorman, A. A. et al. *Helv. Chim. acta.* **1969**, 52, 33-55.

La pycnanthinine (**110**) résulterait du couplage entre la déhydroaspidospermidine (**111**) et le formaldéhyde (**112**) pour former l'iminium (**113**), suivi de l'attaque nucléophile de la pleiocarpamine (**98**) formant ainsi le pont méthylène. Enfin, l'iminium formé (**114**) subirait l'attaque nucléophile du cycle benzénique de la déhydroaspidospermidine pour former la pycnanthinine (**110**) (Figure 90).

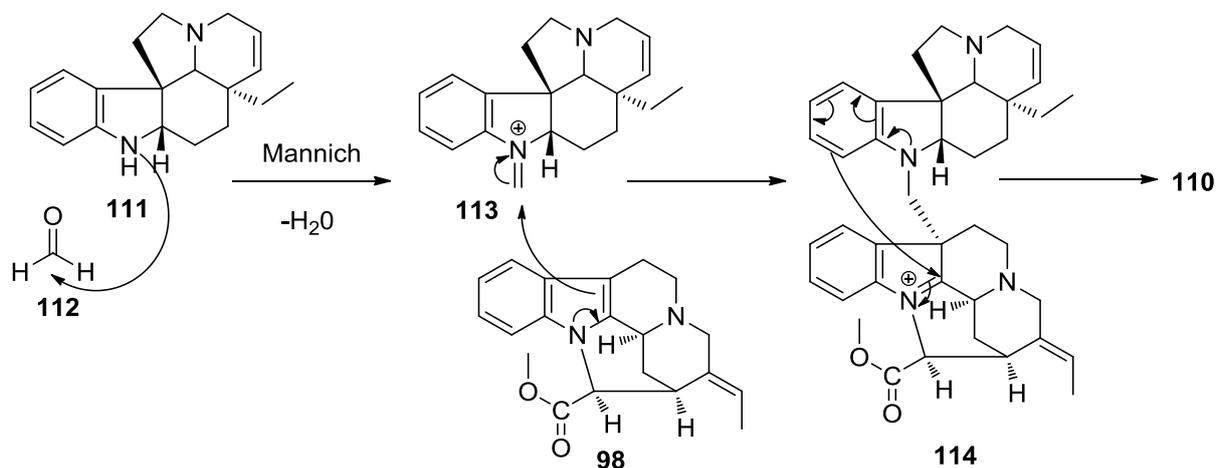


Figure 90. Hypothèse biosynthétique de la pycnanthinine (**110**)¹⁷⁴

1.4.9 Aspidospermane-Ibogane

La biscarpamontamine A (**115**) (Figure 91) est un alcaloïde bisindolique caractérisé par la présence d'un pont méthylène liant une unité aspidospermidine méthylester à la 12-méthoxyechitamidine. Ce composé a été isolé de *Tabernaemontana sphaerocarpa*.¹⁷⁵

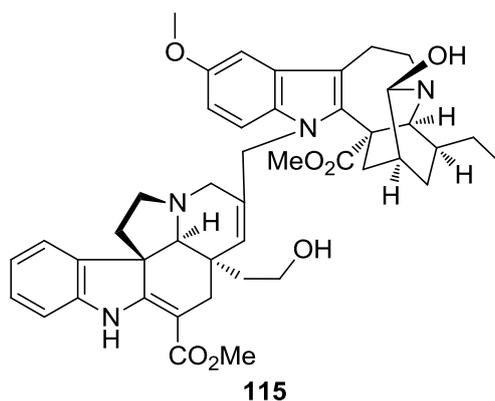


Figure 91. Structure de la biscarpamontamine A (**115**)

¹⁷⁵ Zaima, K. et al. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 1686-1690.

La biscarpamontamine A (**115**) résulterait du couplage entre l'aspidospermidine méthylester (**116**) et la *N*-formyl-12-méthoxyechitamidine (**117**) (Figure 92).

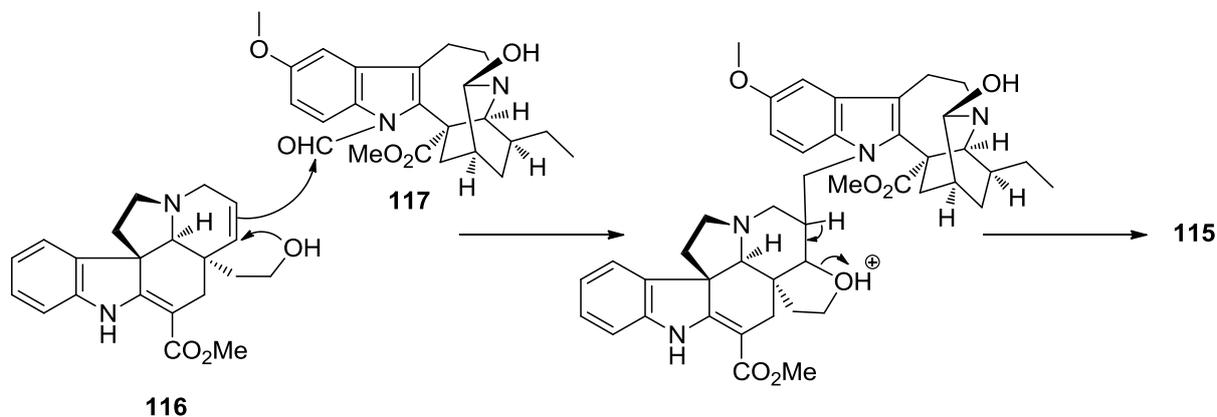


Figure 92. Hypothèse biosynthétique de la biscarpamontamine A (**115**)

La biscarpamontamine A (**115**) a montré une faible cytotoxicité vis-à-vis des lignées cancéreuses HL-60, HCT-116 et MCF-7.

1.4.10 Aspidospermane-Aspidospermane

Il existe de nombreux alcaloïde bisindolique à pont méthylène dans ce groupe. Parmi eux on citera : la vindolicine (**118**), la méthylènebismehranine (**119**), le voacinol (**120**), la melomorsine (**121**) (Figure 93).

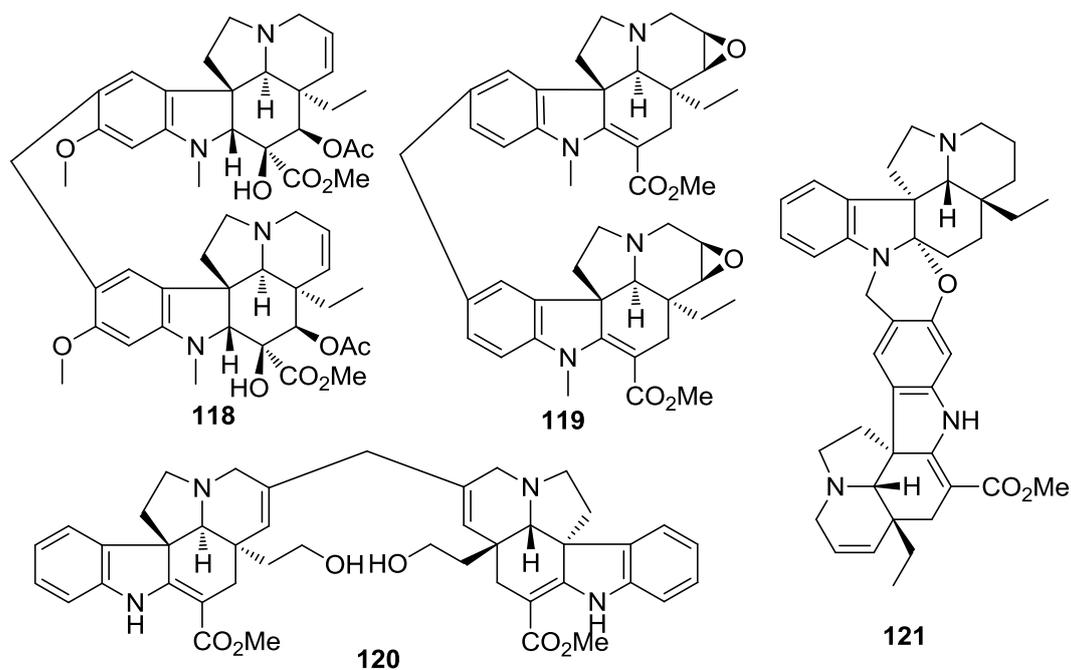


Figure 93. Structures de bisindoles à squelette aspidospermane-aspidospermane

- **La vindolicine (118)** est un alcaloïde dimère qui a été isolé de *Catharanthus longifolius*.¹⁷⁶ La présence du pont méthylène entre les deux monomères constitutifs a suscité des interrogations par rapport à son origine biosynthétique. En effet, la vindolicine a été qualifiée d'artefact d'extraction, du fait que le chloroforme, employé comme solvant, pourrait réagir sous une forme activée selon la réaction de Vilsmeier-Haack, aboutissant à la formation de groupement aldéhyde sur les sommets aromatiques des monomères indoliques.¹⁷⁷
- **La méthylènebismehranine (119)** est un alcaloïde bisindolique qui a été isolé de *Tabernaemontana bovina*.¹⁷⁸ Ce composé est constitué de deux unités (-)-mehranine (**122**) (Figure 94) reliées par un pont méthylène dont l'origine n'a pas été commentée.

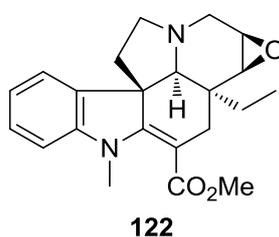


Figure 94. Structure de la (-)-mehranine (122)

- **Le voacinol (120)** est un bisindole qui a été isolé de *Voacanga grandifolia*. En ce qui concerne sa biosynthèse, les auteurs font référence à la participation d'une molécule de formaldéhyde pour expliquer l'origine du pont méthylène.¹⁷⁹
- **La melomorsine (121)** est un alcaloïde bisindolique, isolé des parties aériennes de *Melodinus morsei*. Il est constitué d'une unité tabersonine et une unité aspidospermidine.¹⁸⁰ La formation du cycle reliant les deux monomères n'a pas été commentée par les auteurs.

1.4.11 Aspidospermane-Eburnane

Nous parlerons ici du cas de la callichiline (**123**) (Figure 95), un alcaloïde bisindolique, isolé de *Callichilia subsessilis* dont la structure a été révisée par radiocristallographie.¹⁸¹

L'hypothèse biosynthétique de la callichiline est illustrée dans la Figure 95. Elle est caractérisée par la conversion du squelette aspidospermane (**124**) en eburnane (**125**). Il s'agit d'un réarrangement qui a été proposé par Wenkert.¹⁵⁷

¹⁷⁶ Rabaron, A. et al. *Plant. Med. Phytother.* **1973**, 7, 53-58.

¹⁷⁷ Jacquier, M. J. et al. *Phytochemistry* **1980**, 21, 2973-2977.

¹⁷⁸ Lien, T. P. et al. *Phytochemistry* **1998**, 49, 1797-1799.

¹⁷⁹ Govindachari, T. R. et al. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1987**, 1137-1138.

¹⁸⁰ He, Y.-L. et al. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 411-414.

¹⁸¹ McPhail, A. T. et al. *Tetrahedron* **1983**, 39, 3629-3637.

1.4.12 Eburnane-Eburnane

Les bisindoles de type Eburnane-Eburnane sont très rares. Parmi eux, deux bisindoles à pont méthylène ont été isolés de *Melodinus cestroides*. Si la nature artefactuelle du dichlorure de méthylène N_b, N_{b'}-bis-[(+)-meloninium] (**126**) est très probablement imputable à l'usage du CH₂Cl₂ lors de l'épuisement de la plante,¹⁸² il n'en est peut-être pas de même pour le méthylène-10, 10'-bis-[(+)-N_a-norvallesamidine] (**127**) (Figure 96). Toutefois, la réactivité particulière de C-10 dans le composé (**127**), assimilable à celle du carbone en para dans les anilines, vis-à-vis de réactifs électrophiles est, là encore, en faveur de la genèse d'un artefact.¹⁸³

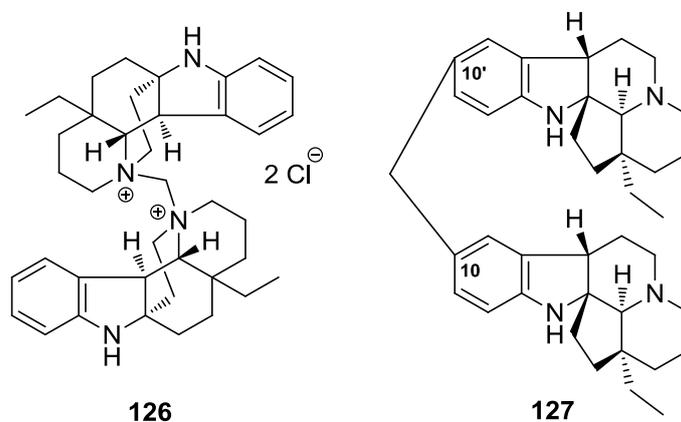


Figure 96. Structures des bisindoles de *Melodinus cestroides*

En conclusion, il s'avère que le pont méthylène permettant de lier deux monomères indoliques, peut avoir diverses origines. En effet, ce méthylène peut être artefactuel comme dans le cas des bisindoles de *Melodinus cestroides*, résiduel comme pour la cynchophilline ou alors provenir du formaldéhyde comme il a été évoqué pour la pycnanthine, le voacinol et l'arundine.

¹⁸² Besselièvre, R. et al. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1972**, *4*, 1477.

¹⁸³ Mehri, H. et al. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 372-379.

2-Travaux personnels

Avant de traiter l'étude phytochimique de *Gonioma malagasy* nous tenons à préciser que cette plante a plus été étudiée sur le plan chimique que biologique. En effet, les travaux d'isolement ayant conduit à l'identification de composés possédant une structure complexe, l'étude s'est orientée plutôt vers la compréhension de leur biogénèse qui a permis de déterminer leur configuration absolue. Si donc dans un premier temps les purifications ont pu être bioguidées, l'intérêt biologique a laissé place à un intérêt plus fondamental. C'est la raison pour laquelle les molécules les plus actives de l'extrait, probablement présentes en faible quantité, n'ont sans doute pas été isolées.

2.1 Étude phytochimique de *Gonioma malagasy*

2.1.1 Récolte et identification

Les écorces et les feuilles de *Gonioma malagasy* ont été récoltées en Octobre 2005 et en Novembre 2011, à Ampandrambazaha, Sakaraha, province de Toliara. La plante a été identifiée par Armand Rakotozafy. Pour la seconde récolte, l'identification a été confirmée par les botanistes du Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza, Antananarivo. Un échantillon (MAD-0161) a été déposé à l'herbier de l'Institut Malgache de Recherches Appliquées.



Figure 97. Carte de Madagascar, localisation du lieu de récolte à Sakaraha (point rouge)

2.1.2 Extraction et purification d'une nouvelle série de bisindoles

Dans un premier temps, 250 g d'écorces de *Gonioma malagasy* (récolte MAD-0161) ont été extraits selon l'extraction classique des alcaloïdes, conduisant à 1,2 g ($\rho = 0,48$ % p/p) d'extrait d'alcaloïdique total. Le fractionnement de cet extrait a permis de purifier 7 composés (**128-134**) dont 4 nouveaux appartenant à la même série chimique (Figure 98).

Afin de démontrer la nature artefactuelle possible de ces composés bisindoliques, une extraction éthanolique des écorces (250 g) a été réalisée à partir de la seconde récolte, menant à 8 g ($\rho = 3,5$ % p/p) d'extrait brut. La purification de cet extrait a permis d'isoler le composé (**129**), qui nous le verrons dans la partie **2.3**, est le précurseur de la série bisindolique. Enfin, dans le but d'isoler les monomères constitutifs de la nouvelle série de bisindole, une extraction alcaloïdique des feuilles a été effectuée, conduisant à 8 g ($\rho = 2$ % p/p) d'extrait à partir de 400 g de plante sèche. La purification de cet extrait a permis de mettre en évidence le monomère (**76**) qui permet d'expliquer la biogénèse et la stéréochimie de la nouvelle série de bisindole.

2.1.2.1 Extrait d'écorces

2.1.2.1.1 Extrait alcaloïdique

L'extrait alcaloïdique (1,1 g) des écorces de *G. malagasy* a été soumis à une colonne ouverte d'alumine (CC) en suivant un gradient $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:0 à 8:2) de polarité croissante. Quinze fractions (**F.1-F.15**) ont été obtenues et rassemblées en fonction de leur profil en chromatographique sur couche mince (CCM). Ces fractions ont été soumises aux tests biologiques sur la souche FcB1 du *P. falciparum*. L'activité biologique a été détectée au sein des fractions (**F.4-F.10**). La purification de ces fractions par CLHP préparative nous a conduit à l'isolement de 4 nouveaux bisindoles (**128, 130-132**) appelés goniomedines (A, C-E) et 3 composés appartenant à la famille des alcaloïdes indolomonoterpéniques, la (+)-aspidofractinine (**133**), l'akuammidine (**134**) et la (+)-pleiocarpamine (**98**).

2.1.2.1.2 Extrait éthanolique

L'extrait éthanolique (8 g) des écorces de *G. malagasy* a été soumis à une purification par CLHP préparative conduisant à l'isolement d'un autre alcaloïde dimère, la goniomedine B (**129**), qui s'est avéré être le composé précurseur probable des alcaloïdes bisindoliques précédents.

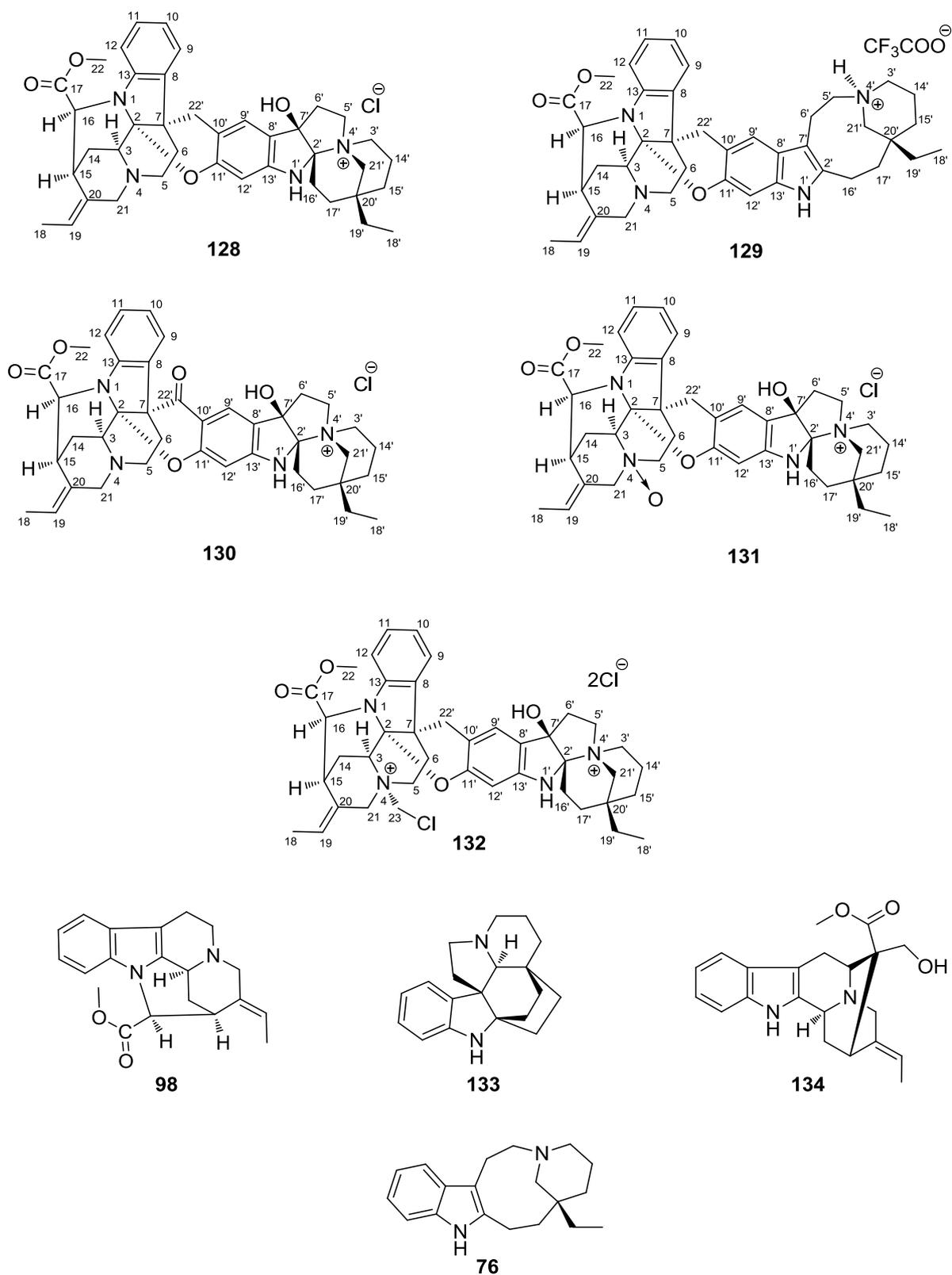


Figure 98. Structures des composés isolés de *G. malagasy*

Le schéma de fractionnement, avec les rendements d'extraction et les activités biologiques antiplasmodiales (FcB1), est présenté Figure 99.

2.1.2.2 Extrait des feuilles

L'extrait alcaloïdique (8 g) des feuilles de *G. malagasy* a été soumis à une colonne ouverte de Sephadex LH-20 (CC) élué par du MeOH. L'emploi de cette phase se justifiait notamment par la taille des molécules, très différentes entre mono- et dimères. Sept fractions (**F.1-F.7**) ont été obtenues et rassemblées en fonction de leurs profils en chromatographique sur couche mince (CCM). Dans le but de mettre en évidence le monomère permettant d'expliquer la biogénèse des goniomedines, (la (-)-quebrachamine (**76**)), les sept fractions ont été analysées par CL/SM. La (-)-quebrachamine (**76**) a été détectée au sein de la fraction **F.5**. La purification de cette fraction par CLHP préparative a permis l'isolement de la (-)-quebrachamine (**76**).

Le schéma d'obtention de la (-)-quebrachamine (**76**) et les rendements d'extraction sont présentés Figure 100.

2.1.2.3 Bilan des extractions

Les travaux phytochimiques entrepris sur les extraits d'écorces et de feuilles de *G. malagasy* ont permis d'isoler neuf produits dont cinq appartiennent à une nouvelle série d'alcaloïdes bisindoliques de type pleiocarpamine-quebrachamine. En référence au nom du genre, nous avons nommé ces produits « goniomedines ». Les quantités obtenues et les rendements globaux sont rapportés dans le Tableau VI.

Tableau VI. Quantités obtenues et rendements d'extraction des composés isolés de *Gonioma malagasy*

Composé	Nom	Masse (mg)	Rendement (% p/p)	
			Ecorces	Feuilles
128	goniomedine A	110	0,04	
129	goniomedine B	10	0,1	
130	goniomedine C	3	0,001	
131	goniomedine D	9	0,003	
132	goniomedine E	73	0,03	
133	(+)-aspidofractinine	10	0,004	
134	akuammidine	12	0,004	
98	(+)-pleiocarpamine	3,5	0,001	
76	(-)-quebrachamine	2		5 x 10 ⁻⁴

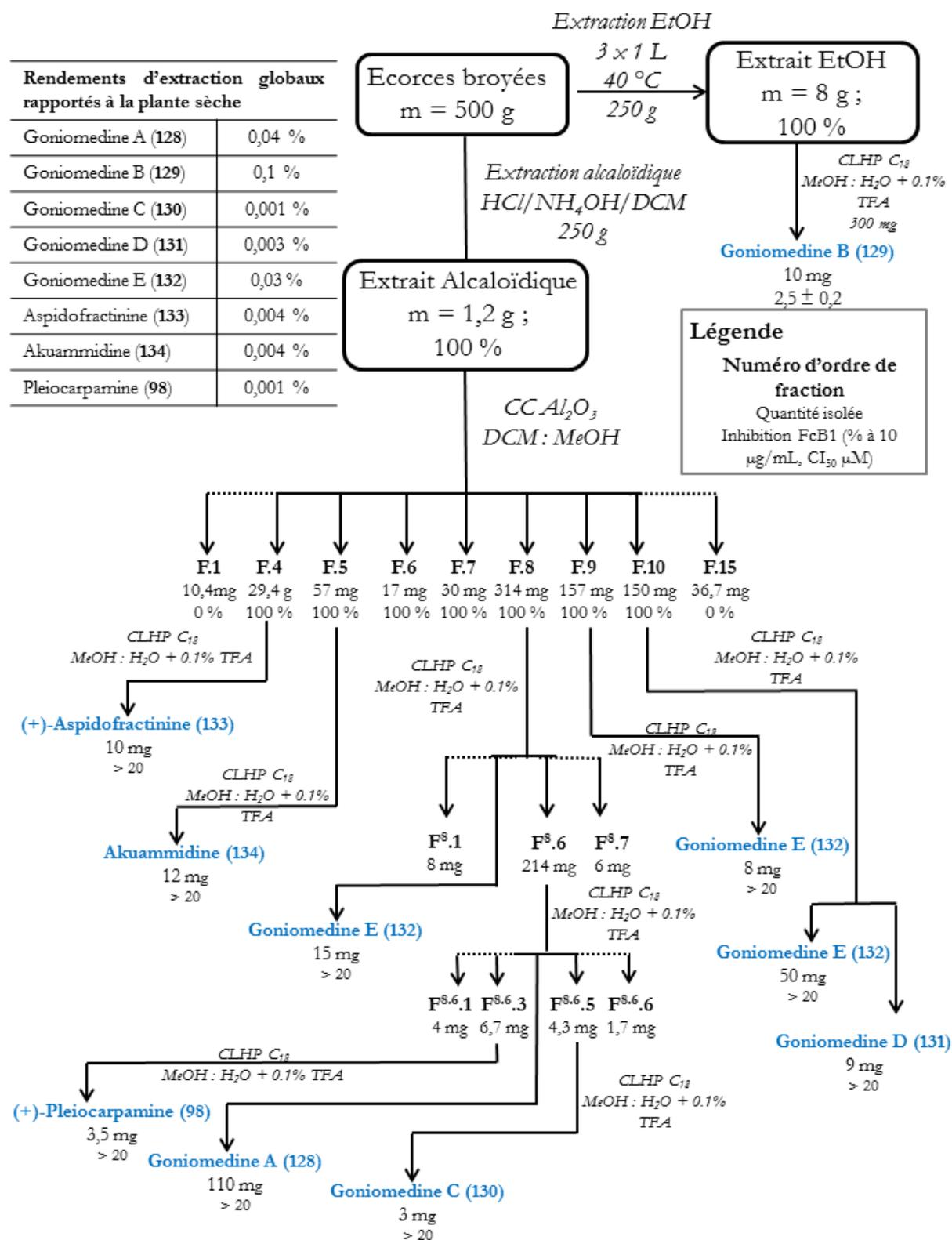


Figure 99. Schéma de purification des composés isolés à partir des extraits alcaloïdique et éthanolique des écorces de *Gonioma malagasy*, et activité biologique sur FcB1 (exprimée en pourcentage d'inhibition à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou en CI_{50} en μM)

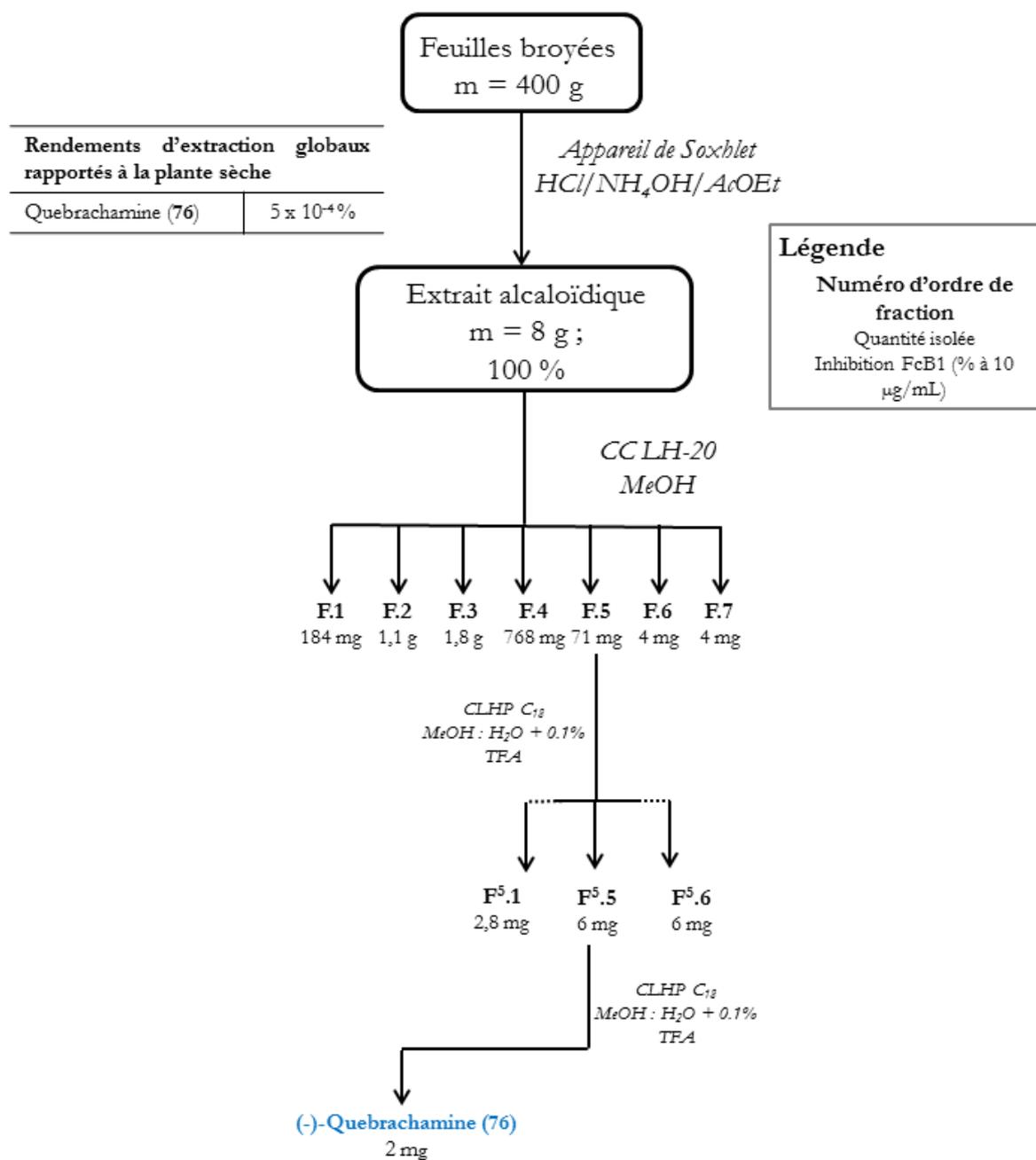


Figure 100. Schéma d'obtention de la (-)-quebrachamine (76) de l'extrait alcaloïdique des feuilles de *Gonioma malagasy*

L'élucidation structurale des goniomedines sera détaillée dans les pages suivantes.

Tous les produits isolés de *G. malagasy* ont été obtenus sous une forme optiquement active. La configuration absolue des composés a été déduite, d'une part par la comparaison des spectres de dichroïsme circulaire théoriques et expérimentaux, et d'autre part grâce à des considérations biosynthétiques. L'étude configurationnelle des goniomedines fera l'objet de la partie **2.2**

Une hypothèse biosynthétique pour la nouvelle série de bisindole sera proposée dans la partie **2.3**

L'activité biologique des goniomedines sera détaillée dans la partie **2.4**

2.1.3 Caractérisation des composés isolés

Les composés (**128-134**) isolés des écorces de *G. malagasy* ont été caractérisés par l'analyse des données spectroscopiques de RMN (1D et 2D) et de masse. Il s'agit d'alcaloïdes bisindoliques de type pleiocarpamine-quebrachamine. Ils se distinguent des bisindoles isolés jusqu'à présent par la présence d'un cycle dihydropyrane reliant les deux unités dihydroindoliques. La numérotation des goniomedines se base sur la numérotation convenue pour les alcaloïdes bisindoliques.

Dans les sections suivantes, l'élucidation de la structure plane de la goniomedine A (**128**) sera détaillée. L'analyse des autres composés mettra l'accent sur les différences observées au sein de la série.

Les spectres RMN 1D et 2D des goniomedines A et B (**128-129**) sont présentés en Annexe 5 et 6, respectivement. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des goniomedines C-E sont présentés en Annexe 7.

Les déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C sont résumés dans le tableau en Annexe 8 pour l'ensemble des goniomedines.

Pour faciliter la lecture, les structures des composés isolés de *G. malagasy* (**128-134**, **76**, **98**) sont représentées sur le volet dépliant de l'Annexe 9.

2.1.3.1 Goniomedine A

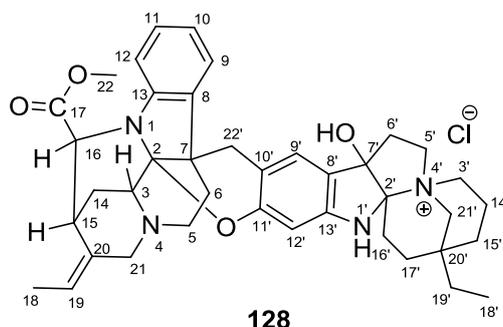


Figure 101. Structure plane de la goniomedine A (**128**)

Le spectre IR présente les bandes d'absorption à 3400 cm^{-1} en faveur de la présence de groupements OH et NH, et à 1750 cm^{-1} pour un ester aliphatique. Le spectre UV est caractéristique du chromophore dihydroindole avec les deux bandes à 254 et 296 nm. Le spectre de masse basse résolution électro-spray en mode d'ionisation positif montre un pic pseudomoléculaire intense à m/z 649,4 et un pic moins intense à m/z 325,2 (Figure 102).

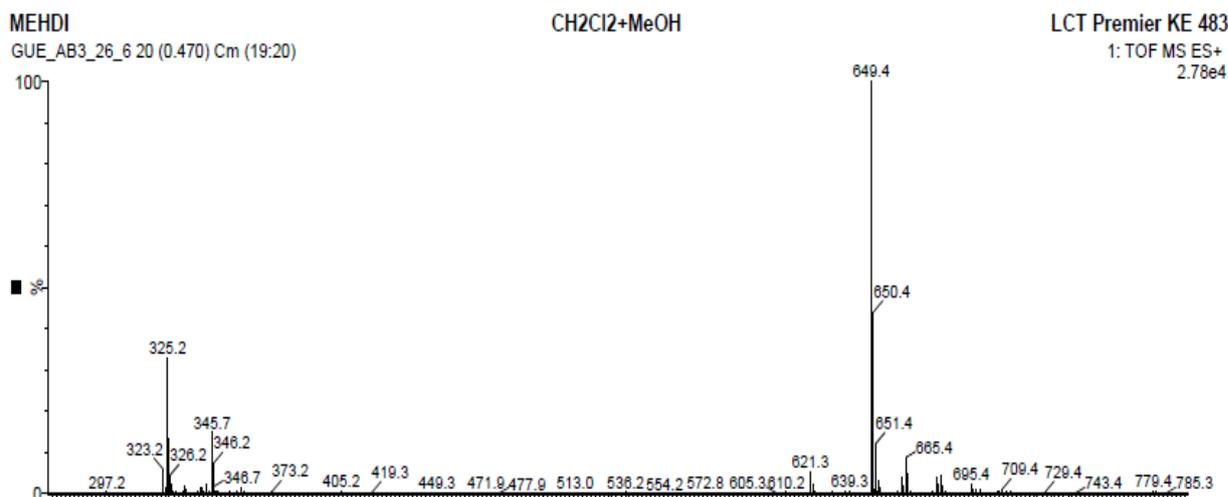


Figure 102. Spectre de masse basse résolution de la goniomedine A (128)

Une observation attentive du massif isotopique du pic à m/z 325,2 a permis de constater un écart d'une demi-unité de masse entre chaque pic ($\Delta m/z = 0,5$) (Figure 103).

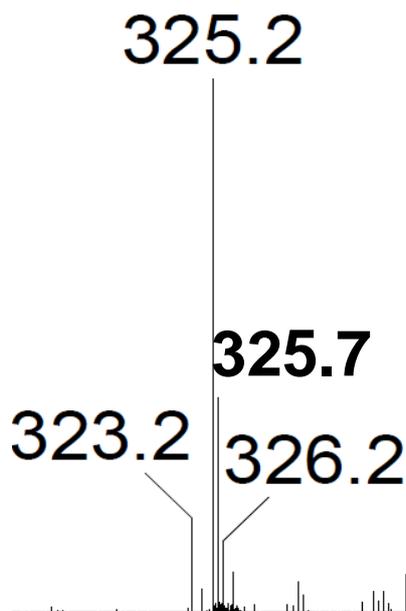


Figure 103. Agrandissement du massif isotopique du pic à m/z 325,2

Cet écart de 0,5 unité de masse, est caractéristique du massif isotopique d'un ion dichargé ($z = 2$). Cette déduction permet d'affirmer que la goniomedine A est une molécule chargée. D'autre part, le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre que cet ion dichargé $[M+H]^{2+}$ à m/z 325,1906 correspond à la formule brute $C_{40}H_{49}N_4O_4$. Le composé présente donc 19 insaturations.

- **Analyse des spectres RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (HSQC)**

Les spectres RMN 1D et 2D suggèrent la présence de 5 carbones quaternaires d'hybridation sp^3 , 14 méthylènes d'hybridation sp^3 , 3 méthines d'hybridation sp^3 , 3 méthyles, 7 méthines d'hybridation sp^2 et 8 carbones quaternaires d'hybridation sp^2 . Parmi eux, 5 méthylènes d'hybridation sp^3 (δ_{C} 46,2; δ_{H} 3,38 et 3,86, δ_{C} 52; δ_{H} 4,74 et 3,82, δ_{C} 56,2; δ_{H} 3,44 et 3,65, δ_{C} 60,3; δ_{H} 3,31 et 3,59, δ_{C} 61,9; δ_{H} 3,29 et 3,69), 2 méthines d'hybridation sp^3 (δ_{C} 50,4; δ_{H} 4,15, δ_{C} 57,1; δ_{H} 4,66), 2 carbones quaternaires d'hybridation sp^3 (δ_{C} 93,3, δ_{C} 100,8) et 2 carbones quaternaires d'hybridation sp^2 (δ_{C} 145,5, δ_{C} 146,3) sont liés à un atome d'azote (Figure 104) et (Figure 105).

- **Attribution des protons aux carbones : spectre HSQC**

Tableau VII. Données RMN de la goniomedine A (128) (DMF- d_7 , 600 MHz)

Position	δ_{H} (mult, J , Hz)	δ_{C}
2		93,3
3	4,15 (1H, br s)	50,4
5	3,38 (1H, br d, 13) ; 3,86 (1H, td, 13, 5)	46,2
6	2,22 (2H, m)	30,7
7		43,1
8		134,3
9	7,33 (1H, d, 7,2)	121,9
10	6,84 (1H, dd, 7,2, 7,8)	120,6
11	7,10 (1H, t, 7,8)	127,8
12	6,42 (1H, d, 7,8)	110,8
13		145,5
14	2,14 (1H, m) ; 2,93 (1H, m)	24,9
15	3,59 (1H, m)	30,2
16	4,66 (1H, d, 3,8)	57,1
17		169,6
18	1,65 (3H, dd, 6,7, 1,9)	11,9
19	5,65 (1H, qd, 6,7, 1,9)	124,2
20		130,2
21	4,74 (1H, br d, 13,4) ; 3,82 (1H, m)	52,0
22	3,83 (3H, s)	52,2
2'		100,8
3'	3,44 (1H, td, 13,5, 5,1) ; 3,65 (1H, dd, 13,5, 4,0)	56,2
5'	3,31 (1H, m) ; 3,59 (1H, m)	60,3
6'	2,41 (1H, m) ; 2,91 (1H, m)	37,8
7'		88,9
8'		125,0
9'	7,12 (1H, s)	124,0
10'		110,6
11'		154,6
12'	6,05 (1H, s)	96,7
13'		146,3
14'	1,84 (1H, m) ; 2,46 (1H, m)	19,2
15'	1,74 (1H, m) ; 1,55 (1H, td, 13,2, 6,3)	30,3
16'	2,17 (1H, m) ; 2,47 (1H, m)	28,3
17'	1,73 (2H, m)	30,0
18'	0,86 (3H, t, 7,6)	6,4
19'	1,31 (2H, q, 7,6)	33,9
20'		31,6
21'	3,29 (1H, d, 12) ; 3,69 (1H, d, 12)	61,9
22'	3,49 (1H, d, 17,2) ; 3,53 (1H, d, 17,2)	25,7
1'NH	7,16 (1H, s)	

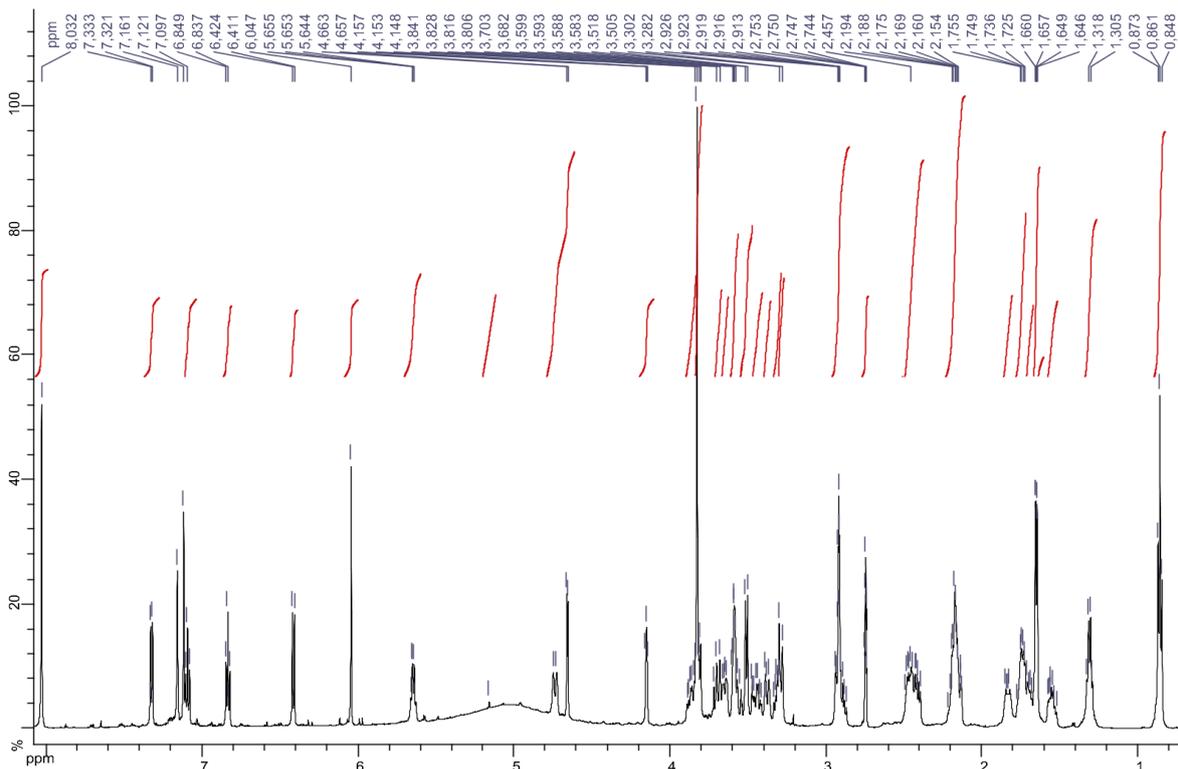


Figure 104. Spectre RMN ^1H (600 MHz) de la goniomedine A (128) dans le $\text{DMF-}d_7$

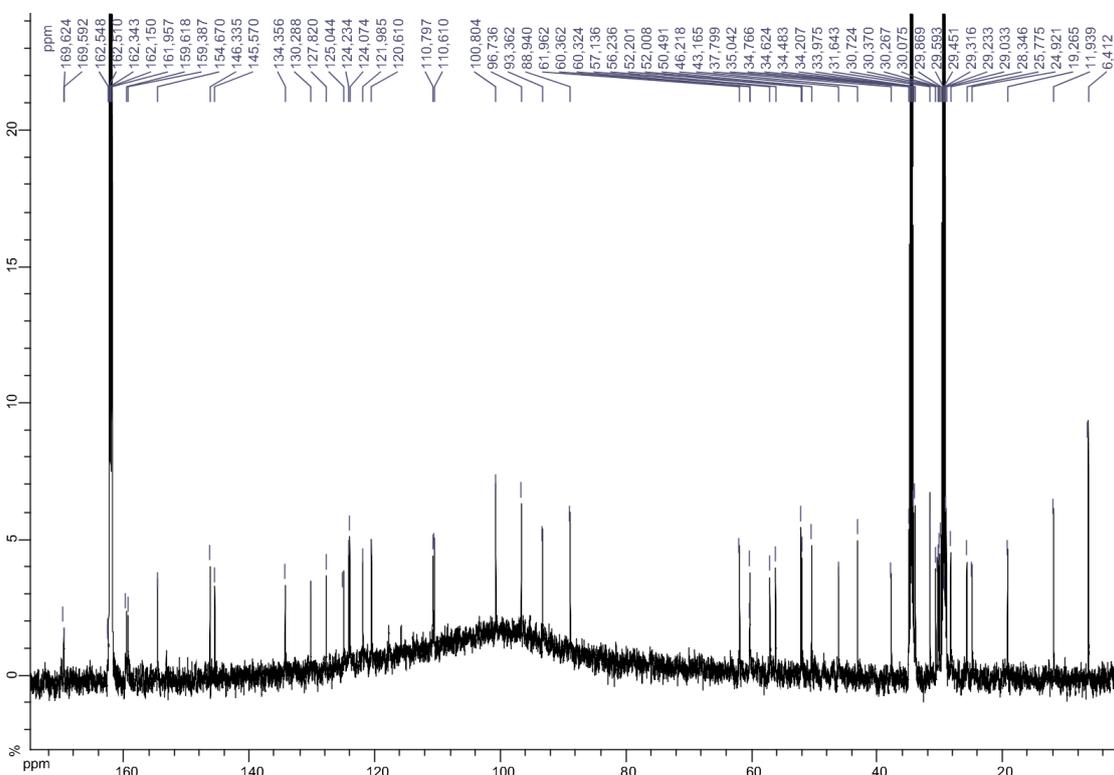


Figure 105. Spectre RMN ^{13}C (150 MHz) de la goniomedine A (128) dans le $\text{DMF-}d_7$

- Analyse des spectres RMN 2D et construction de la structure

La structure plane de la goniomedine A (Figure 101) a été déduite après une étude approfondie des spectres RMN 2D (COSY, TOCSY et HMBC).

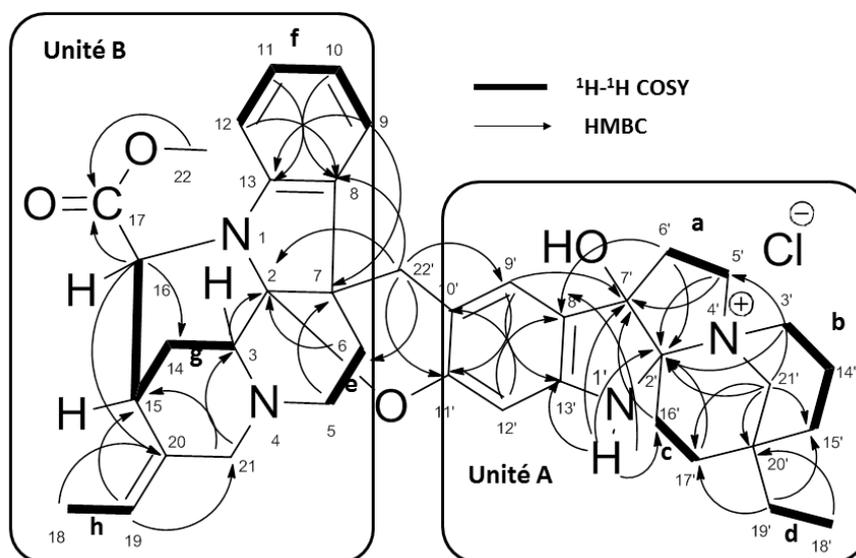


Figure 106. Principales corrélations HMBC et COSY de la goniomedine A (128)

Les corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC ont permis de distinguer des connexions entre 8 structures partielles (a-h) comme il est indiqué sur la Figure 106. Ces structures partielles ont été réparties en 2 unités : l'unité A et l'unité B.

Dans l'unité A, la structure partielle **a** a été reliée au noyau dihydroindolique (C-2', C-7'—C-13' and N-1') grâce aux corrélations HMBC observées entre H₂-5' et C-7' et C-2', et entre H₂-6' et C-2'. Par ailleurs, les structures partielles **a**, **b**, **c** et **d** ont pu être reliées grâce aux corrélations HMBC observée entre H₂-21' et C-2', C-5', C-15', C-17' et C-20'. De plus, l'intense corrélation HMBC observée entre H-3' et C-2' a permis la construction du motif pyrroloindole. Ces observations au niveau de l'unité A, sont en faveur de la rhazidine,¹⁸⁴ un alcaloïde indolomonoterpéniques de type quebrachamine qui a été isolé de *G. kamassi*.¹⁴⁵

Dans l'unité B, la structure partielle **e** a été reliée à **f** et son noyau dihydroindolique (C-2, C-7—C-13 and N-1) grâce aux corrélations HMBC observées entre H-9 et C-7, H-6 et C-2. Par ailleurs, la connexion entre les carbones C-3 et C-2 a été déterminée par la corrélation HMBC observée entre H-3 et C-2. Cela implique le fait que la structure partielle **g** est liée au noyau dihydroindolique précédent. De plus, les corrélations HMBC observées entre H₃-18 et C-20, et entre H-19 et C-15 et C-21 ont permis de localiser le groupement éthylidène en C-20 d'une part et de relier la structure partielle **h** aux trois autres (**f**, **e** et **g**). L'ensemble de ces observations au

¹⁸⁴ Éles, J. et al. *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, *39*, 767-771.

niveau de l'unité B ainsi que la présence du doublet à δ_H 4,66 ($J = 3,8$ Hz) sur le spectre RMN 1H de **128** sont en faveur de la pleiocarpamine.¹⁸⁵

Il faut noter que le fort déblindage du carbone quaternaire C-2 indique qu'il est lié à la fois à un atome d'oxygène et à un atome d'azote, tandis que le déplacement chimique de C-7 indique qu'il n'est relié à aucun hétéroatome. Ces déplacements chimiques sont communément observés chez les bisindoles incorporant la pleiocarpamine tels que la villalstonine,¹⁶⁷ la pleiocorine¹⁸⁶ et la pleiocraline.¹⁸⁷

Le fait que les deux unités, rhazidine et pleiocarpamine, comptent pour 18 insaturations, laisse supposer la présence d'un cycle supplémentaire dans la goniomedine A (**128**) reliant les unités A et B. En effet, l'examen des spectres RMN 1 et 2D permet d'identifier un signal à δ_C/δ_H (25,7; 3,53 et 3,49, système AB) correspondant au méthylène C-22'. Les corrélations HMBC observées entre H₂-22' et les carbones C-2, C-6, C-8, C-9' et C-11' suggèrent que ce méthylène appartient à un dihydropyrane assurant la fusion entre les deux unités dihydroindoliques. De ce fait, la goniomedine A (**128**) correspond à un alcaloïde bisindolique possédant une structure originale dans laquelle les 2 unités dihydroindoliques sont fusionnées via un cycle dihydropyrane.

2.1.3.2 Goniomedine B

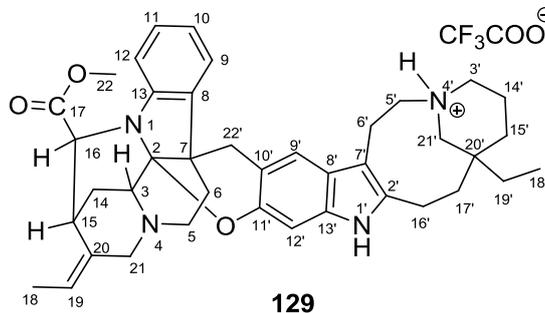


Figure 107. Structure plane de la goniomedine B (**129**)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudomoléculaire $[M]^+$ à m/z 633.3799 correspondant à la formule brute $C_{40}H_{49}N_4O_3$. Le composé présente donc 19 insaturations.

¹⁸⁵ Kam, T.-S. et al. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3749-3752.

¹⁸⁶ Das, B. C. et al. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 4299-4302.

¹⁸⁷ Das, B. C. et al. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 2785-2786.

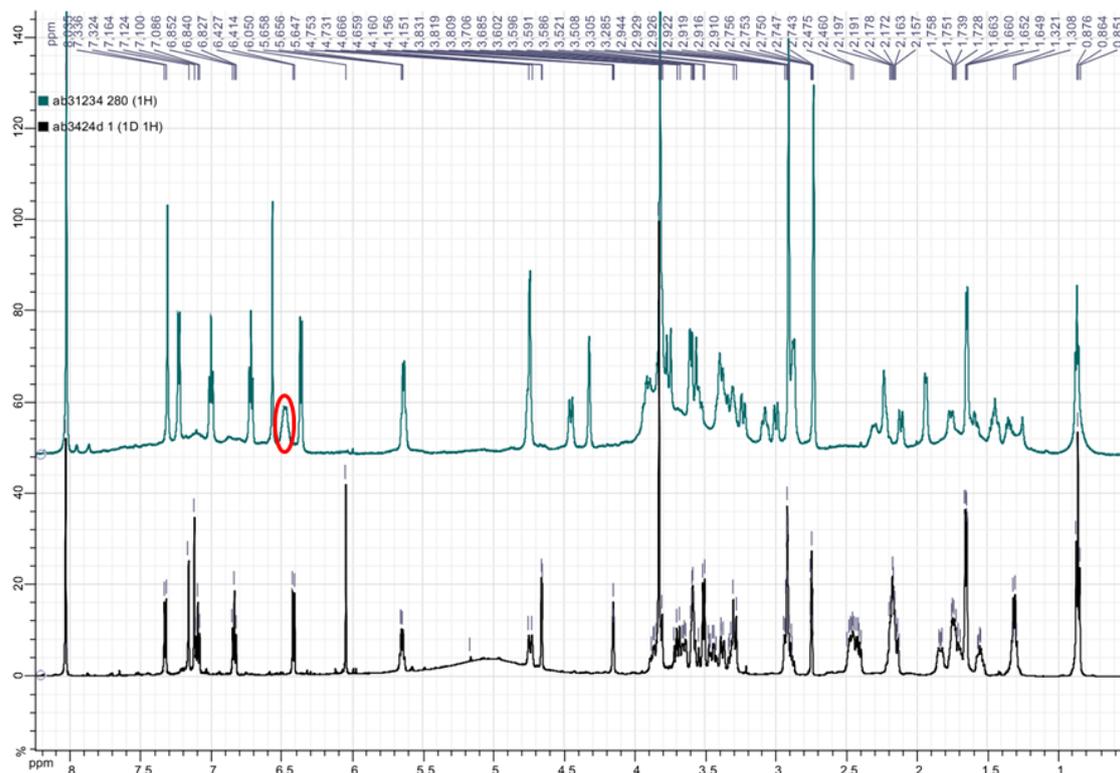


Figure 108. Superposition des spectres RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMF-}d_7$) de la goniomedine B (en vert) et de la goniomedine A (en noir)

Les spectres RMN ^1H des goniomedines A et B présentent beaucoup d'analogies (Figure 108). Toutefois, nous pouvons noter la présence d'un signal supplémentaire correspondant à un proton échangeable à δ_{H} 6,47 (encerclé en rouge sur le spectre de la goniomedine B). Ce proton a pu être localisé grâce aux corrélations TOCSY observées entre H-4' et les protons H-5', H-6', H-3', H-14', H-15' et H-21' comme indiqué sur la Figure 109.

Le spectre RMN ^{13}C , quant à lui, fait apparaître deux signaux correspondant à deux carbones quaternaires d'hybridation sp^2 C-7' et C-2' à δ_{C} 102,9 et 139,0, respectivement. Ces deux carbones remplacent les carbones quaternaires d'hybridation sp^3 , retrouvés dans la goniomedine A.

De plus, le spectre RMN ^{13}C indique également la présence de deux quadruplets à δ_{C} 160,3 et 118,3 (Figure 110).¹⁸⁸ Curieusement, ces deux carbones ne corrélerent avec un aucun proton appartenant à la goniomedine B sur les spectres HSQC et HMBC, et n'ont jamais été observés avec une telle intensité dans les autres goniomedines. Il s'agit, en fait, des deux carbones constituant le contre-ion trifluoroacétate (additif qui a été employé pour acidifier la phase mobile en CLHP préparative). Cette multiplicité est expliquée par le couplage spin-spin existant entre les noyaux du ^{13}C et du ^{19}F (possédant le même nombre de spin).

¹⁸⁸ Les deux raies périphériques du quadruplet à 118,3 ppm, étant peu intenses, sont confondues dans la ligne de base.

Ces arguments indiquent que la goniomedine B diffère de la goniomedine A au niveau de l'unité rhazidine. En effet, cette dernière a été clairement substituée par une unité quebrachamine protonée comme l'indique la structure plane de la goniomedine B dans la Figure 107.

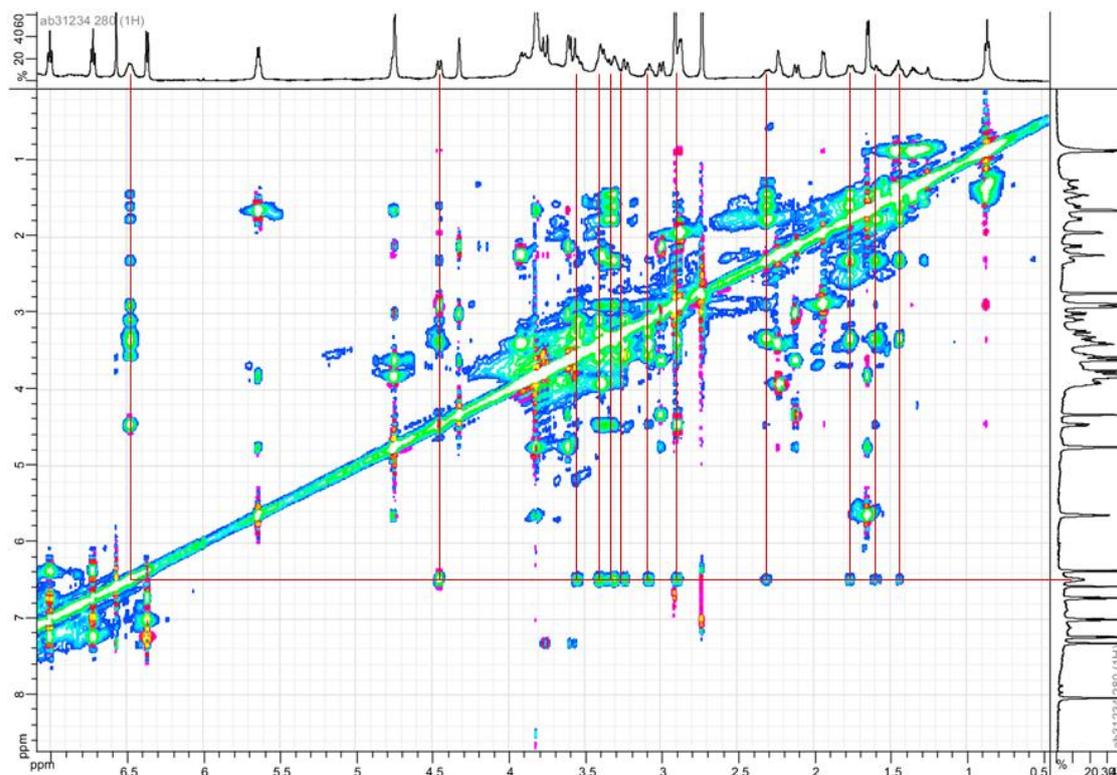


Figure 109. Corrélations TOCSY (600 MHz, DMF- d_7) du proton H-4'

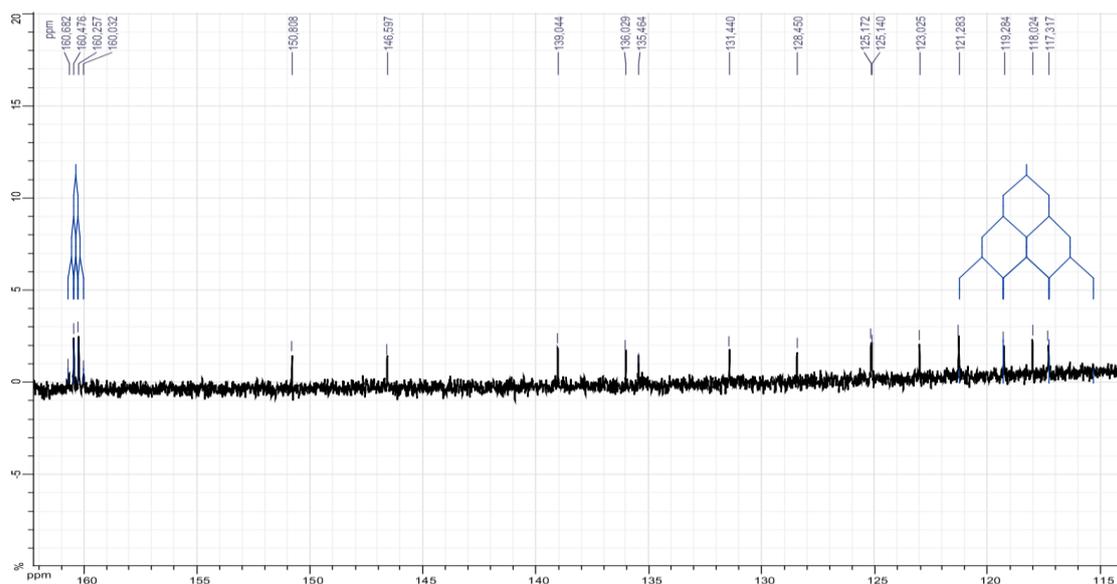


Figure 110. Signaux de l'anion trifluoroacétate sur le spectre RMN ^{13}C (150 MHz, DMF- d_7) de la goniomedine B

2.1.3.3 Goniomedine C

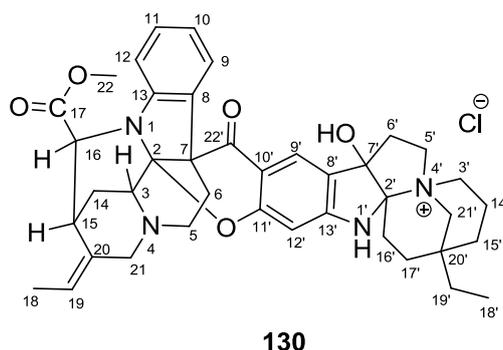


Figure 111. Structure plane de la goniomedine C (130)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudomoléculaire $[M]^+$ à m/z 663,3566 correspondant à la formule brute $C_{40}H_{47}N_4O_5$. Le composé présente donc 20 insaturations.

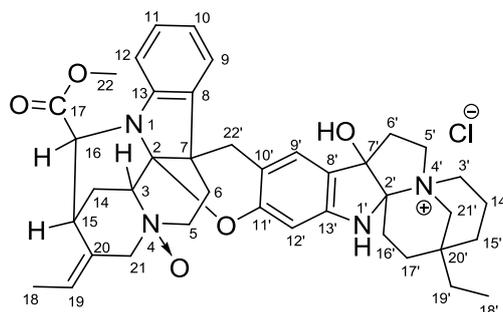
Le spectre RMN 1H de la goniomedine C présente beaucoup de similitudes à celui de la goniomedine A, si ce n'est l'absence du système AB caractéristique du groupement méthylène assurant la jonction entre les deux unités dihydroindoliques.

Le spectre RMN ^{13}C de la goniomedine C indique la présence d'un signal supplémentaire dans la zone des carbonyles à δ_c 187,2 (C-22').

La localisation du carbonyle C-22' a été confirmée par la corrélation HMBC observée entre H-9' et le carbone C-22'. Malheureusement, les signaux larges des protons H-6a et H-6b ne permettent pas d'observer de corrélations HMBC avec le carbonyle C-22'.

Ces observations sont en faveur de la structure plane proposée pour la goniomedine C dans la Figure 111, où le cycle dihydropyran de la goniomedine A a été substitué par un cycle de type dihydropyran-4-one.

2.1.3.4 Goniomedine D



131

Figure 112. Structure plane de la goniomedine D (131)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un pic pseudomoléculaire $[M]^+$ à m/z 665,3701 correspondant à la formule brute $C_{40}H_{49}N_4O_5$. Le composé présente donc 19 insaturations.

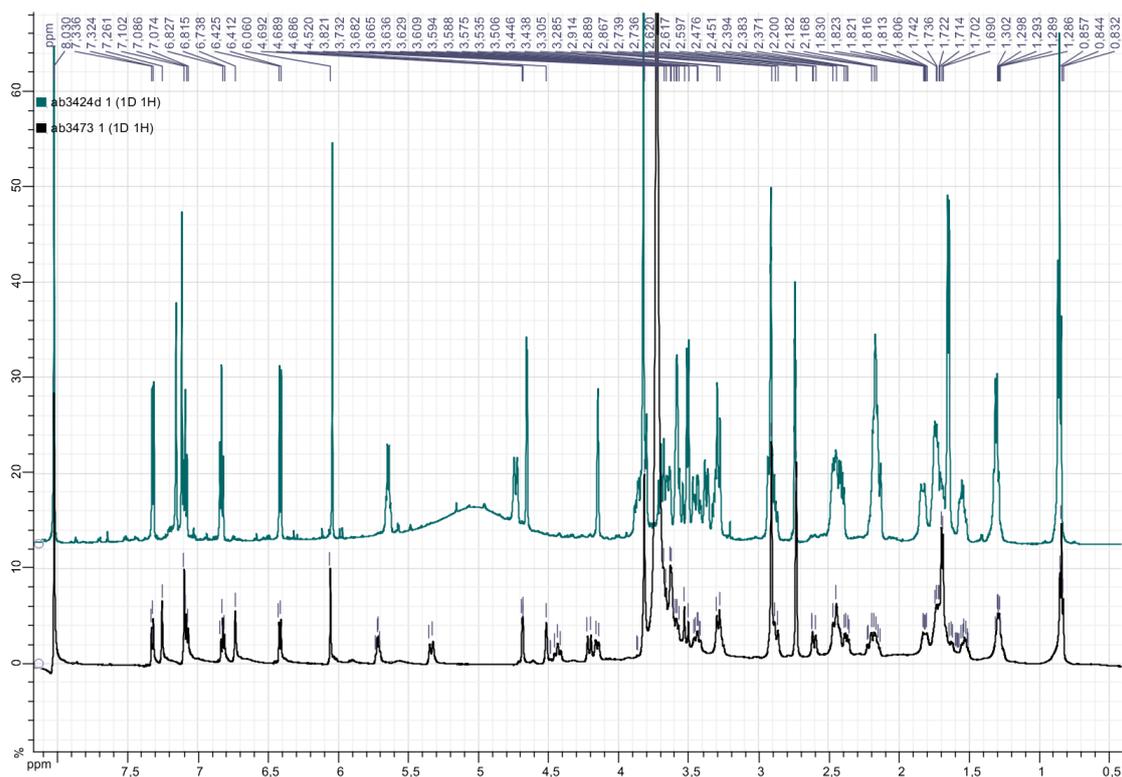


Figure 113. Superposition des spectres RMN 1H (600 MHz, $DMF-d_7$) de la goniomedine D (en noir) et de la goniomedine A (en vert)

Les spectres RMN ^1H des goniomedines A et D présentent beaucoup de similitudes (Figure 113). On notera tout de même, des différences, entre 4,00 et 5,50 ppm, caractérisées par un déblindage des signaux émanant des méthylènes liés à l'azote N-4 de l'unité pleiocarpamine. De plus, on notera également, la présence sur le spectre RMN ^1H de la goniomedine D, d'un signal supplémentaire (singulet large) correspondant à un proton échangeable à δ_{H} 6,73. Ce signal correspond à l'alcool tertiaire de l'unité rhazidine. Ceci a été confirmé par les corrélations HMBC observées entre le l'OH-7' et les carbones C-8', C-7' et C-6' (Figure 114). Curieusement, nous n'avons pas réussi à observer le signal de cet alcool tertiaire dans les goniomedines A, C et E à température ambiante.

Enfin, la différence de 16 unités de masse entre les goniomedines A et D ainsi que l'ensemble des observations précédentes sont en faveur de la structure plane proposée pour la goniomedine D dans la Figure 112. Il s'agit ici de l'analogue N-oxyde de la goniomedine A.

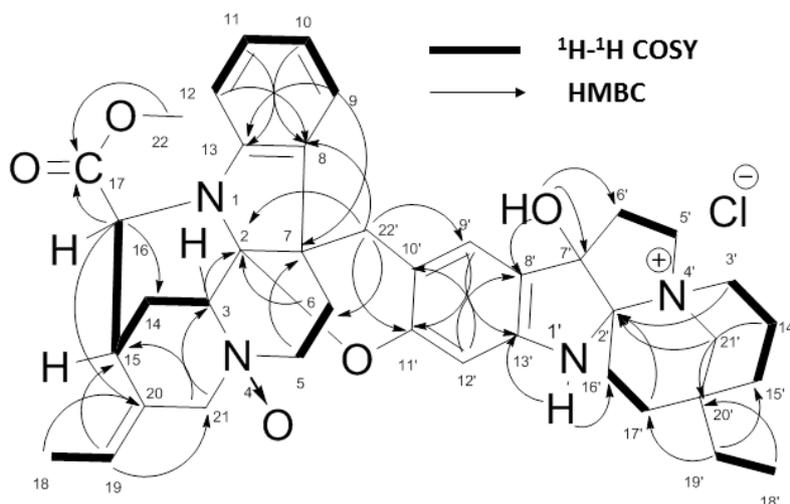


Figure 114. Principales corrélations HMBC et COSY de la goniomedine D (131)

2.1.3.5 Goniomedine E

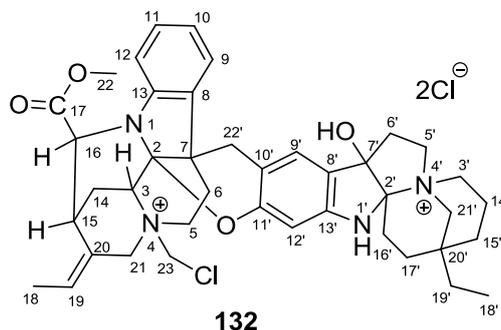


Figure 115. Structure plane de la goniomedine E (132)

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES+) montre un massif isotopique d'ion dichargé $[M]^{2+}$ à m/z 349,1731 correspondant à la formule brute $C_{41}H_{51}N_4O_4Cl$. Le massif isotopique caractéristique confirme bien la présence d'un seul atome de chlore.

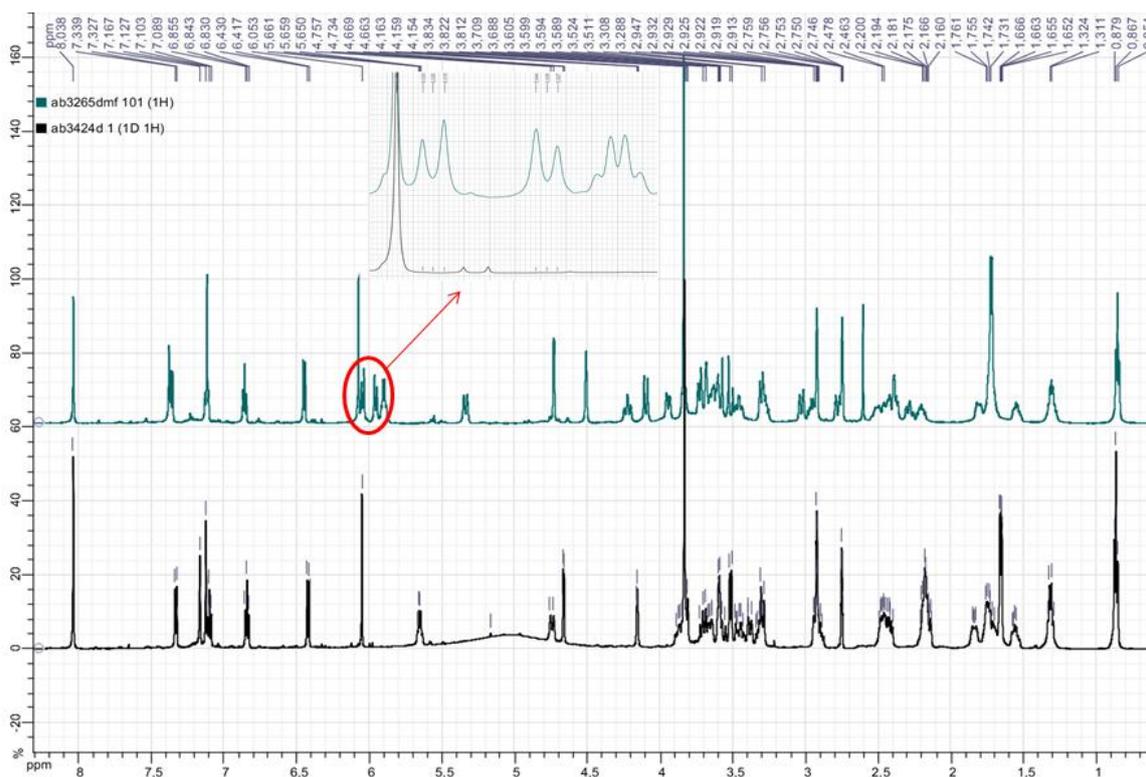


Figure 116. Superposition des spectres RMN 1H (600 MHz, DMF- d_7) de la goniomedine E (en vert) et de la goniomedine A (en noir) et agrandissement du système AB de la goniomedine E

La comparaison des spectres RMN ^1H des goniomedines A et E (Figure 116) indique que ces deux composés sont très proches structuralement. Néanmoins, on observe un système "AB" supplémentaire sur le spectre de la goniomedine E (voir agrandissement de la zone encerclée en rouge) à δ_{H} (5,95, 6,03 ; d, $J = 10$ Hz).

Le spectre RMN 2D HSQC de la goniomedine E permet d'attribuer le système AB observé sur le spectre RMN ^1H à un méthylène déblindé apparaissant à δ_{C} 68,2.

Enfin, la position de ce méthylène a été confirmée par les corrélations HMBC observées entre H₂-23 et les carbones C-5 et C-3. Cela prouve l'engagement de ce groupement dans la quaternarisation de l'azote N-4 de la pleiocarpamine. De plus, le déplacement chimique de ce CH₂ montre qu'il est également lié à un chlore.

L'ensemble de ces arguments est en faveur de la structure plane proposée pour la goniomedine E dans la Figure 115. Il s'agit probablement d'un artefact d'extraction, imputable à l'usage du CH₂Cl₂ lors de l'épuisement de la plante.¹⁸²

2.1.3.5 Contre-ion des goniomedines (A, C-E)

Le contre-ion des goniomedines A, C-E a été déterminé comme étant des ions chlorures. En effet, l'emploi d'HCl lors de l'extraction alcaloïdique et l'obtention d'un précipité caractéristique lors du traitement des composés avec le nitrate d'argent sont de forts arguments en faveur de cette hypothèse.

2.2 Détermination de la configuration absolue des goniomedines

2.2.1 Goniomedine A

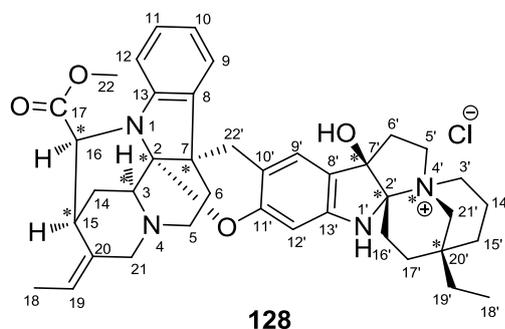


Figure 117. Centres asymétriques de la goniomedine A (128)

La goniomedine A possède 9 centres asymétriques : C-2, C-7, C-3, C-15, C-16, C-2', N-4', C-7' et C-20' (Figure 117). Afin de déterminer les configurations relatives de ces centres, nous avons analysé le spectre RMN 2D ROESY de la goniomedine A.

- **Étude configurationnelle des unités constitutives**

Afin de simplifier l'analyse du spectre ROESY, nous avons décidé d'étudier la stéréochimie de chaque unité indolomonoterpéniques avant de nous intéresser à la molécule entière.

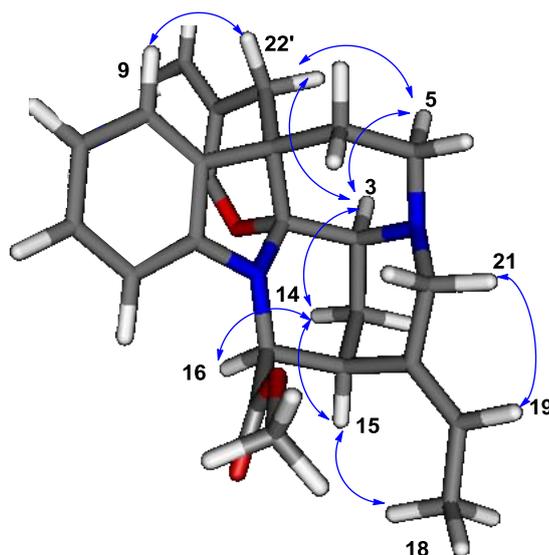


Figure 118. Principales corrélations ROESY de l'unité dihydropleiocarpamine (double flèche bleue)

Dans l'unité dihydropleiocarpamine (Figure 118), les corrélations ROESY observées entre H-3/H-5a, H-14a et H₂-22', et entre H-14a/H-15 et H-16 indiquent que ces protons ont la même orientation. Par ailleurs, les corrélations H-19/H-21 et H₃/H-15 permettent d'attribuer la configuration *E* au groupement éthylidène.

La configuration relative de cette unité dihydropleiocarpamine a été déterminée comme étant 2*R**, 3*S**, 7*S**, 15*S**, 16*S**. Il est intéressant de noter que la (+) pleiocarpamine (**98**) possède les configurations absolues 3*S*, 15*S*, 16*S* pour ces 3 centres asymétriques.

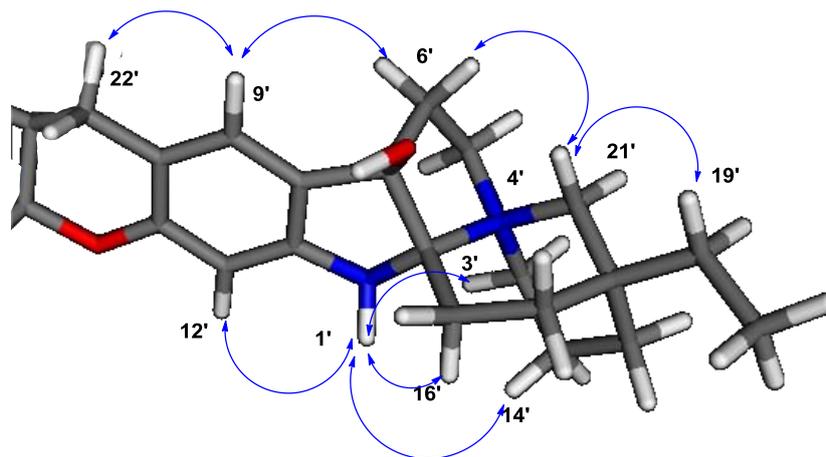


Figure 119. Principales corrélations ROESY de l'unité rhazidine (double flèche bleue)

Dans l'unité rhazidine (Figure 119), les corrélations ROESY observées entre H-21'/H-6' et H₂-19' indiquent que ces protons ont la même orientation que nous avons arbitrairement fixé comme étant β pour la série des goniomedines. En conséquence, les corrélations NH-1'/H-3', H-14' et H-16' suggèrent que ceux-ci sont orientés en α .

La configuration relative de cette unité rhazidine a été déterminée comme étant 2'*S**, 4'*S**, 7'*R**, 20'*S**. Il est intéressant de noter que cette stéréochimie correspond à celle de la (-)-rhazidine (**77**).

- **Assemblage des unités constitutives**

La détermination de la configuration relative des unités constitutives laisse supposer que la goniomedine A peut être représentée sous la forme de 4 stéréoisomères, chaque stéréoisomère étant constitué d'une unité (+)- ou (-)-pleiocarpamine liée à une unité (+)- ou (-)-rhazidine. Ces différentes possibilités sont illustrées dans la Figure 120.

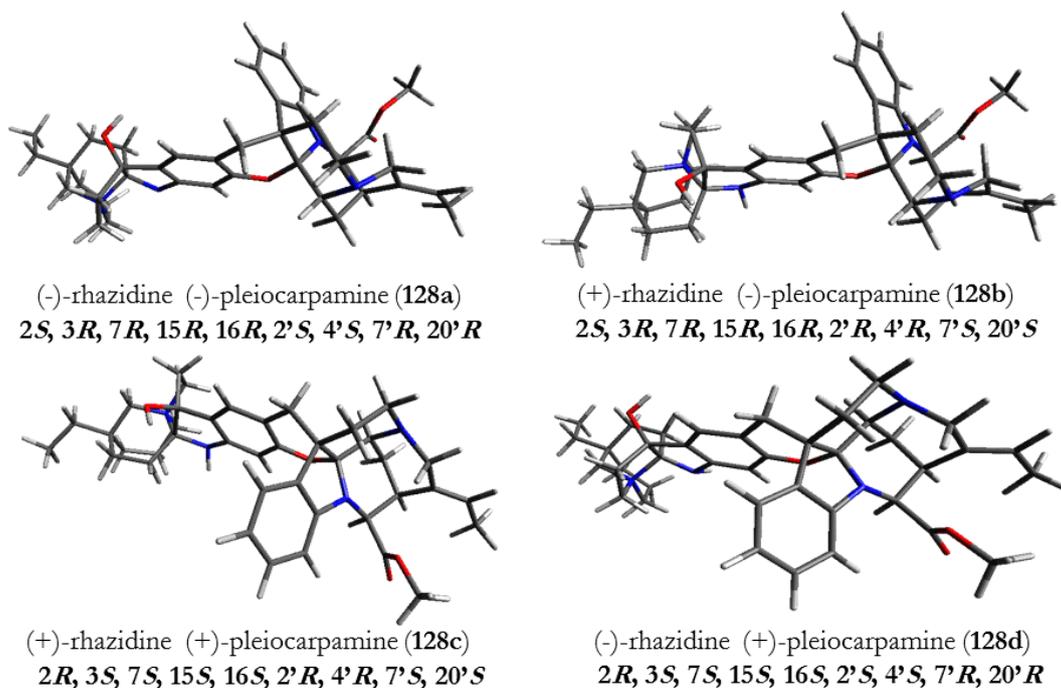


Figure 120. Stéréoisomères possibles de la goniomedine A (128a-128d) et leurs stéréochimies respectives

Lors de la détermination de la configuration relative de la goniomedine A, nous avons constaté, qu'à l'exception des protons aromatiques H-9' et H-12', les protons de l'unité dihydropleiocarpamine ne corrélaient pas avec ceux de l'unité rhazidine. En effet, la distance entre deux protons potentiellement proches, portés par les 2 sous-unités, est d'au moins 5 à 6 Å (Figure 121), ce qui exclut la possibilité d'observer des corrélations ROESY. Ces mesures ont été réalisées sur les conformères les plus stables de deux des 4 stéréoisomères de la goniomedine A (les deux autres étant leurs miroirs) obtenus après minimisation énergétique. Les interactions de spins à travers l'espace étant limitées à 4 Å, l'analyse du spectre ROESY, seule, ne nous a donc pas permis de déterminer la configuration relative de la goniomedine A.

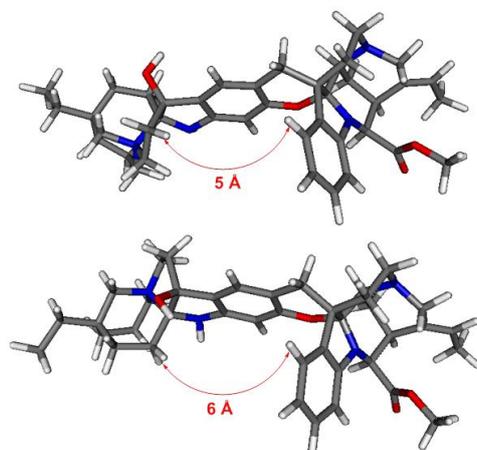


Figure 121. Distances entre les unités constitutives de deux diastéréoisomères possibles de la goniomedine A

- **Calcul de spectre de dichroïsme circulaire**

Comme décrit précédemment, (section 2.2.1.2 de la deuxième partie), il existe différentes façons d'interpréter les courbes de DC (règles de l'octant, Exciton chirality etc.). Nous présentons, ici, une autre manière d'interpréter les courbes de DC de molécules ne possédant pas de références structurales connues.

En effet, grâce au développement de la chimie quantique et des méthodes de calculs associées, il est désormais possible de prédire de façon théorique les spectres de DC de molécules de configuration donnée. La comparaison des spectres expérimentaux et calculés donne alors accès à la configuration absolue de la molécule.

Les méthodes de calcul théoriques de spectres de DC ont permis la détermination de la configuration absolue de nombreux composés chiraux.¹⁸⁹ Plusieurs méthodes de chimie quantique sont disponibles pour ces calculs, mais la plus utilisée actuellement est sans doute la méthode TDDFT¹⁹⁰ (Time-Dependent Density Functionnal Theory ou théorie de la fonctionnelle de la densité dépendante du temps) au niveau B3LYP/6-31G.¹⁹¹

D'une certaine manière, la rigidité structurale de la goniomedine A (**128**) conduit à un temps de calcul plus court et à une recherche conformationnelle plus directe que pour une molécule flexible,¹⁹² faisant de la goniomedine A un bon candidat pour ce type d'approche.

En revanche, l'impossibilité de déterminer la configuration relative de la goniomedine A, implique l'étude systématique des quatre stéréoisomères possibles, afin de sélectionner le spectre de DC calculé le plus proche du spectre expérimental.

Mille conformères sont générés, pour les quatre stéréoisomères (**128a-128d**), de manière aléatoire par la méthode Monte Carlo puis minimisés énergétiquement par mécanique moléculaire.

Par la suite, nous utilisons les données issues de la RMN (corrélations ROESY) comme contrainte dans un processus de sélection des conformères. Nous « filtrons » les 1000 conformères générés pour retenir uniquement ceux dont les distances inter-atomiques suivantes sont inférieures à 4 Å : Me-18/H-15, H-19/H₂-21, H-15/H₂-14, H-16/H-14a, H₂-22'/H-9, H₂-22'/H-9', H₂-22'/H-5a, H₂-22'/H-3, H-9'/H₂-6', H₂-19'/H₂-21', H₂-21'/H₂-6', NH-1'/H-12', NH-1'/H₂-3', NH-1'/H₂-14', NH-1'/H₂-16'.¹⁹³

¹⁸⁹ Bringmann, G. et al. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 2717-2727.

¹⁹⁰ Gross, E. et al. *Density Functional Theory II* **1996**, 181, 81-172.

¹⁹¹ B3LYP/6-31G est une fonctionnelle. Sommairement, elle indique le niveau de précision de la TDDFT, c'est un compromis entre exactitude et temps de calcul.

¹⁹² Pescitelli, G. et al. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4603-4625.

¹⁹³ Corrélations observées sur le spectre ROESY de la goniomedine A.

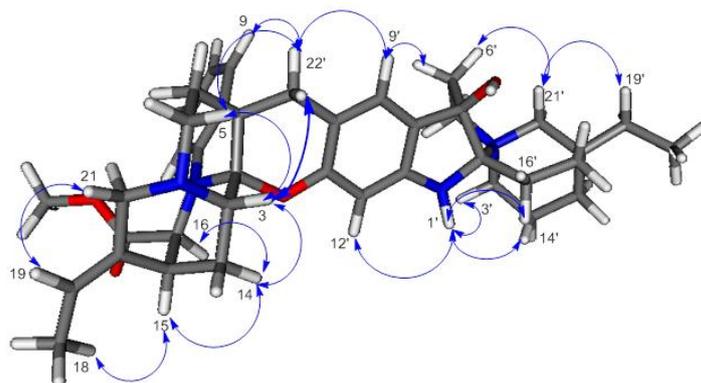


Figure 122. Conformère optimisé de la goniomedine A et corrélations ROESY (128d)

La géométrie du conformère de plus basse énergie (Figure 122) est optimisée par calcul *ab initio* en employant la méthode 'TDDFT' au niveau B3LYP/6-31G sur le logiciel *Gaussian09*. Les courbes de DC calculées pour les 4 stéréoisomères (128a-128d) sont mises en regard de la courbe expérimentale de la goniomedine A (Figure 123).

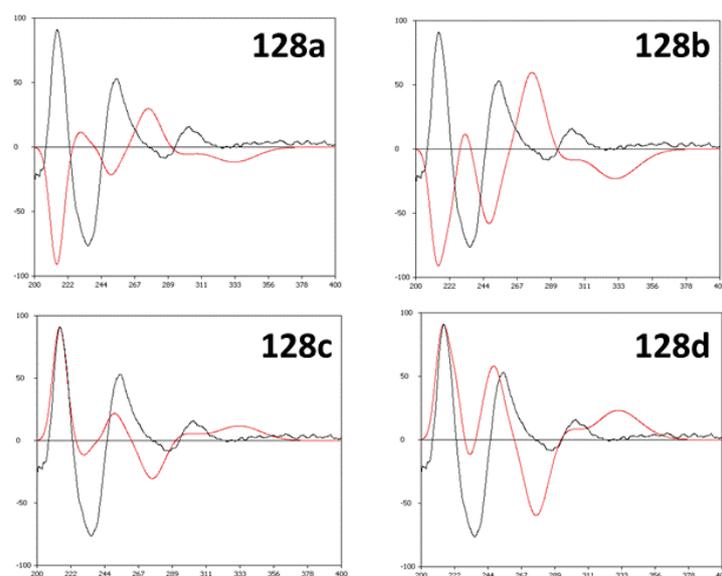


Figure 123. Courbes de DC calculées des 4 stéréoisomères (128a-128d) en rouge et courbe de DC expérimentale de la goniomedine A (128) en noir

A la lecture de la Figure 123 ci-dessus, on remarque que les diastéréoisomères **128c** et **128d**, partageant la même stéréochimie pour la dihydropleiocarpamine, possèdent les courbes calculées les plus proches de la courbe expérimentale. En revanche, cette étude ne nous permet pas, à ce stade, de trancher entre ces deux diastéréoisomères et d'en déduire la configuration absolue de la goniomedine A.

- **Considérations biosynthétiques**

Étant dans l'incapacité de résoudre la stéréochimie de la goniomedine A à l'aide des méthodes spectroscopiques, nous avons décidé de nous tourner vers des arguments d'ordre

biosynthétiques. En effet, si les monomères constituant la goniomedine A pouvaient être isolés et caractérisés, cela nous conduirait à la configuration absolue recherchée.

D'autre part, comme les études de simulation de courbes de DC indiquaient que les deux diastéréoisomères retenus partageaient la même stéréochimie pour la dihydropleiocarpamine. Nous nous sommes intéressés à la rhazidine. En effet, Elès a réalisé l'hémisynthèse de la (+)-rhazidine (**137**) par oxydation de la (+)-quebrachamine (**135**), suivie d'une cyclisation en milieu acide de la rhazidigénine (**136**) (Figure 124).¹⁸⁴ De ce fait, on peut supposer que l'on puisse obtenir de la (-)-rhazidine à partir de la (-)-quebrachamine.

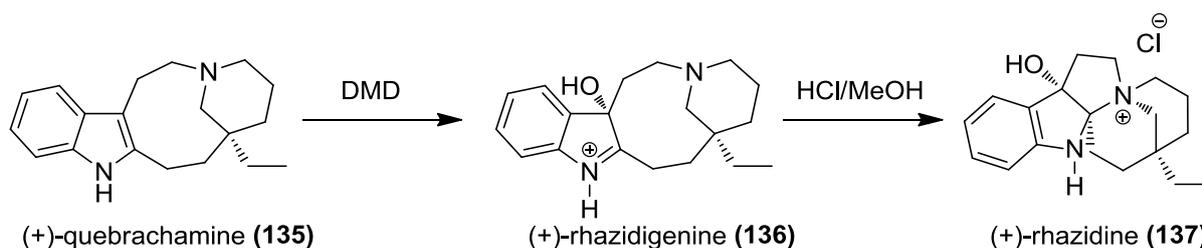


Figure 124. Hémisynthèse de la (+)-rhazidine (**137**)

Cette hémisynthèse a attiré notre attention et nous a permis de supposer que la goniomedine A (**128**) pourrait être un artefact formé durant l'extraction alcaloïdique. Cette hypothèse a été confirmée en partie lorsque l'étude phytochimique de l'extrait éthanolique des écorces de *G. malagasy* a permis l'isolement d'un autre dimère que nous avons appelé goniomedine B (**129**), tandis que la goniomedine A (**128**) était absente de cet extrait.

Afin de valider cette hypothèse, la goniomedine B (**129**) a été soumise aux conditions d'une extraction alcaloïdique avec un passage base-acide à température ambiante. A l'issue de cette manipulation, l'analyse et la purification des phases organiques ont conduit à l'isolement de la goniomedine A (**128**) avec un rendement de 20 % (Figure 125).

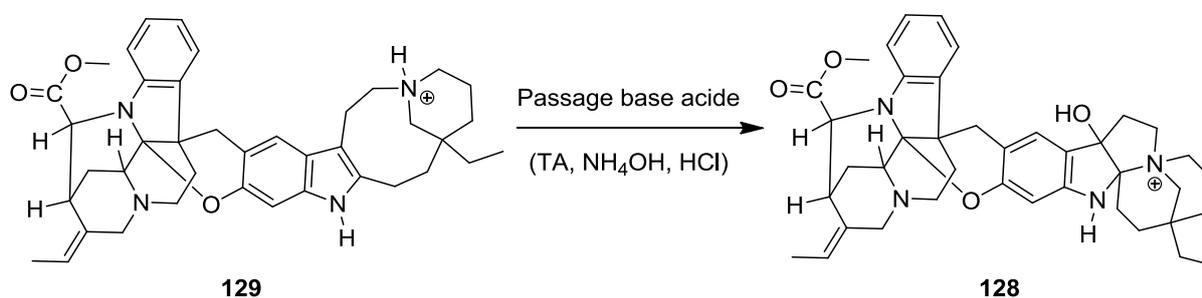


Figure 125. Obtention de la goniomedine A (**128**) à partir de la goniomedine B (**129**)

Finalement, le fait que la goniomedine A et la goniomedine B possèdent la même unité dihydropleiocarpamine, (résultant certainement de la (+)-pleiocarpamine isolée dans l'extrait alcaloïdique des écorces) implique que leur configuration absolue est basée sur la stéréochimie de l'unité quebrachamine.

L'étude phytochimique des extraits alcaloïdiques des écorces et des feuilles a conduit à l'isolement et à l'identification de la (+)-pleiocarpamine (**98**) et la (-)-quebrachamine (**76**).

Ces éléments nous ont finalement permis de déterminer la configuration absolue de la goniomedine A (**128**) comme étant : 2*R*, 3*S*, 7*S*, 15*S*, 16*S*, 2'*S*, 4'*S*, 7'*R*, 20'*R*. De ce fait, le stéréoisomère qui vérifiait cette stéréochimie est le **128d**.

2.2.2 Goniomedine B

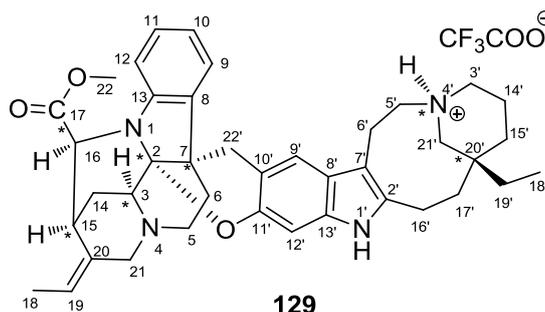


Figure 126. Centres asymétriques de la goniomedine B (**129**)

La goniomedine B (**129**) possède 7 centres asymétriques (2 de moins que la goniomedine A) représentés par : C-2, C-7, C-3, C-15, C-16, N-4' et C-20' (Figure 126). Afin de déterminer la stéréochimie de ces centres, nous avons analysé le spectre RMN 2D ROESY de la goniomedine B.

- **Détermination de la configuration relative de la partie quebrachamine**

Nous présentons ici, la configuration relative de la quebrachamine, l'unité dihydropleiocarpamine étant similaire à celle de la goniomedine A.

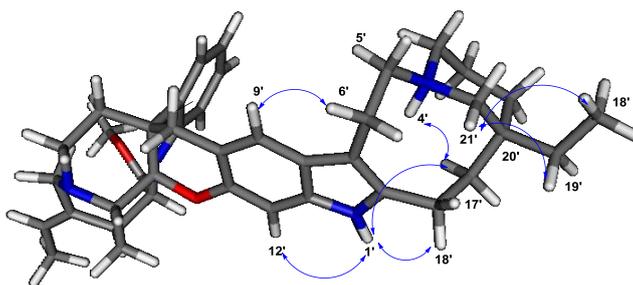


Figure 127. Corrélations ROESY de la goniomedine B (**129**)

Dans l'unité quebrachamine (Figure 127), les corrélations ROESY observées entre NH-4' et H₂-17' et entre H-19' et H-21', indiquent clairement que le groupement éthyle en C-20' possède une orientation *anti* par rapport au proton NH-4'. De ce fait, la configuration relative de cette unité a été déterminée comme étant 4'*R**, 20'*R**. Enfin, l'identification de la (+)-

pleiocarpamine (**98**) et de la (-)-quebrachamine (**76**) dans la plante, permet de proposer la configuration absolue suivante à la goniomedine B : 2*R*, 3*S*, 7*S*, 15*S*, 16*S*, 4'*R*, 20'*R*.

2.2.3 Goniomedine C

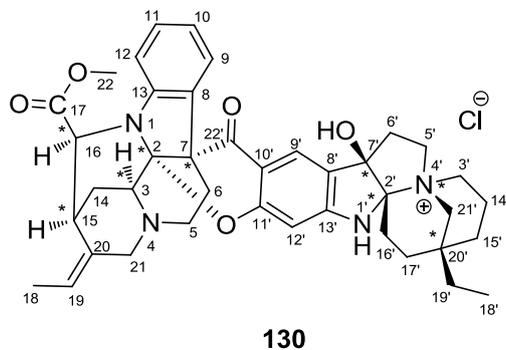


Figure 128. Centres asymétriques de la goniomedine C (**130**)

La goniomedine C (**130**) présente les mêmes centres asymétriques que la goniomedine A (**128**) (Figure 128). En revanche les courbes de DC de la goniomedine A (**128**) et C (**130**) sont légèrement différentes du fait de la présence du carbonyle 22'. Nous ne pouvons donc pas extrapoler la configuration absolue la goniomedine A à la goniomedine C en se basant sur cet argument.

Afin de déterminer la configuration absolue de la goniomedine C (**130**) nous avons employé la même stratégie que pour la goniomedine A (**128**). En effet, après avoir analysé le spectre ROESY, nous avons déterminé la stéréochimie relative des unités constitutives. Ensuite, nous avons comparé la courbe de DC expérimentale de la goniomedine C aux courbes de DC calculées des 4 stéréoisomères possibles (**130a-130d**) (Figure 129).

On remarque que les diastéréoisomères **130c** et **130d**, partageant la même stéréochimie pour la dihydropleiocarpamine, possèdent les courbes calculées (en bleu) les plus proches de la courbe expérimentale. En revanche, cette étude de calcul de courbes de DC ne nous permet pas, à ce stade, de trancher entre les deux diastéréoisomères et de déterminer la configuration absolue de la goniomedine C.

Par ailleurs, en se basant sur les arguments biosynthétiques avancés pour la goniomedine A par rapport à la stéréochimie de l'unité rhazidine, nous pouvons proposer la stéréochimie absolue 2*R*, 3*S*, 7*S*, 15*S*, 16*S*, 2'*S*, 4'*S*, 7'*R*, 20'*R* pour ce composé. De ce fait, le stéréoisomère qui vérifiait cette stéréochimie est le **130d**.

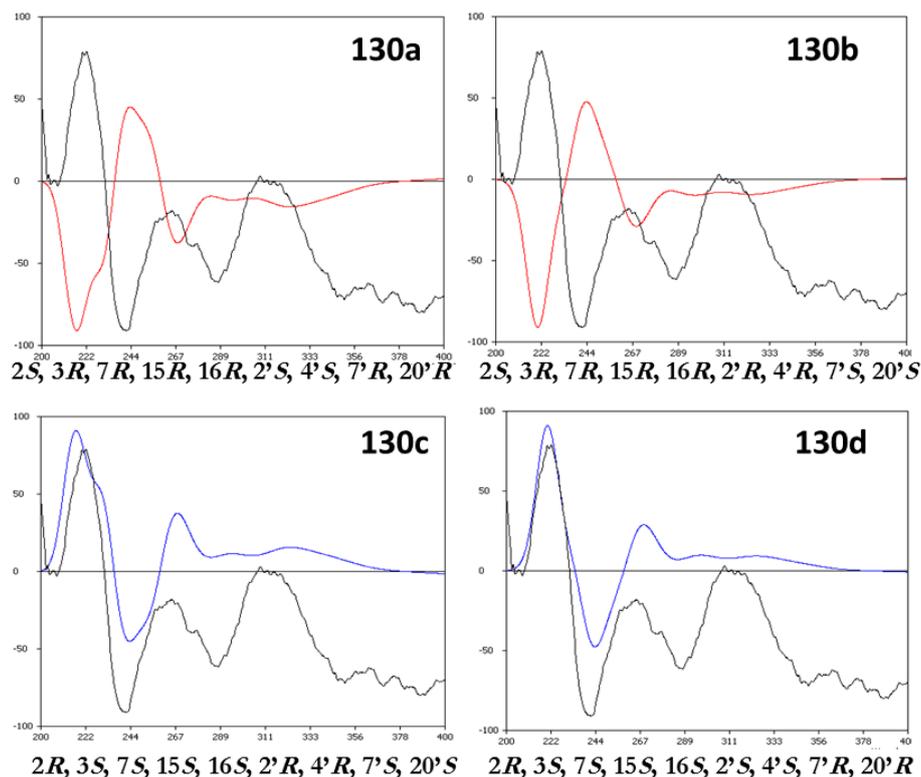
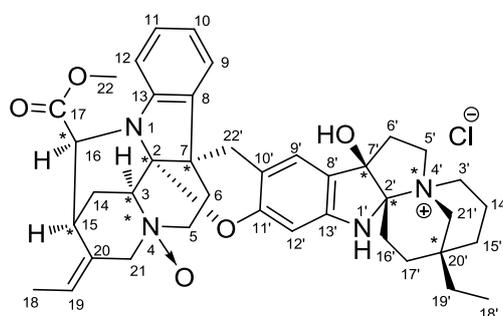


Figure 129. Courbes de DC calculées des 4 stéréoisomères (130a-130d) en rouge et bleu et courbe de DC expérimentale de la goniomedine C (130) en noir

2.2.4 Goniomedine D



131

Figure 130. Centres asymétriques de la goniomedine D (131)

Comme on peut le constater sur la Figure 130 ci-dessus, la goniomedine D (**131**) est très proche structurellement de la goniomedine A (**128**). En effet, il s'agit de la forme N-oxyde de la goniomedine A. Suite à la formation de cette liaison dative, la goniomedine D (**131**) présente donc un centre asymétrique supplémentaire par rapport à son précurseur.

Comme on peut l'observer sur la Figure 131 ci-après, les courbes de DC de la goniomedine A (**128**) et D (**131**) sont superposables. De plus, ces composés appartenant à la même série chimique, on peut donc aisément extrapoler le résultat obtenu pour la goniomedine

A à la goniomedine D en lui assignant la configuration absolue ; 2*R*, 3*S*, 4*R*, 7*S*, 15*S*, 16*S*, 2'*S*, 4'*S*, 7'*R*, 20'*R*.

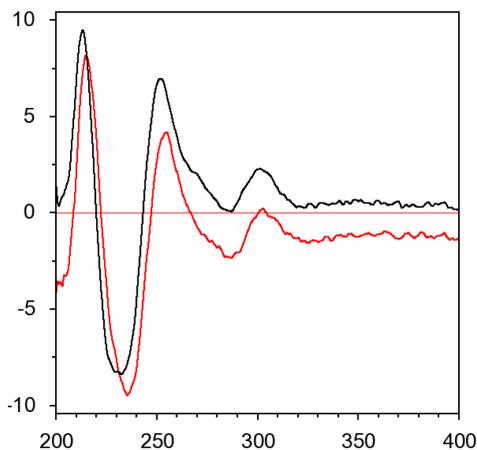


Figure 131. Comparaison spectre de DC de la goniomedine A (rouge) et de la goniomedine D (noir)

2.2.5 Goniomedine E

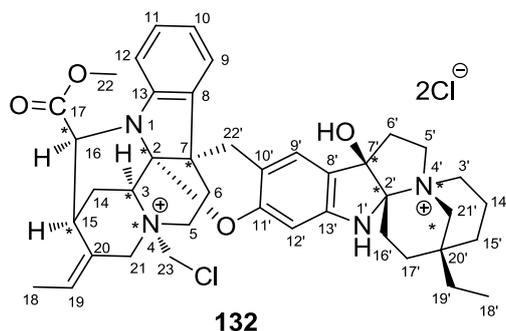


Figure 132. Centres asymétriques de la goniomedine E (132)

Comme on peut le constater sur la Figure 132 ci-dessus, la goniomedine E (**132**) est très proche structurellement de la goniomedine A (**128**). En effet, il s'agit de l'artefact chloré obtenu par la quaternarisation de l'amine tertiaire (N-4) de l'unité dihydropleiocarpamine de la goniomedine A. Suite à cette quaternarisation, la goniomedine E (**132**) présente donc un centre asymétrique supplémentaire par rapport à son précurseur non chloré.

- **Détermination de la configuration relative de l'unité dihydropleiocarpamine chlorée**

Comme l'unité rhazidine est strictement identique à celle de la goniomedine A, et afin de simplifier l'analyse du spectre ROESY, nous avons décidé d'étudier la stéréochimie de l'unité dihydropleiocarpamine qui a subi la quaternarisation de son amine tertiaire (N-4).

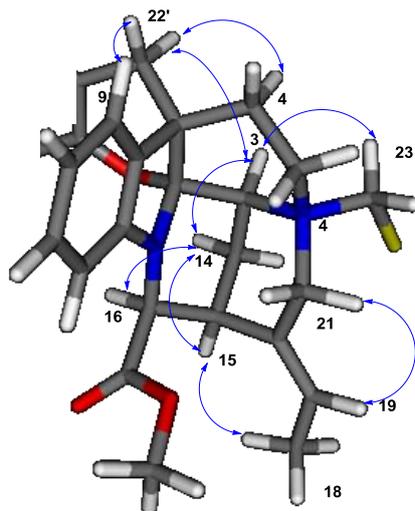


Figure 133. Principales corrélations ROESY de l'unité dihydropleiocarpamine chlorée (double flèche bleue)

Dans l'unité dihydropleiocarpamine (Figure 133), les corrélations ROESY observées entre H-3/H₂-23, H-14a et H₂-22', et H-14a/H-15 et H-16 indiquent que ces protons ont la même orientation. Par ailleurs, les corrélations H-19/H-21 et H₃-18/H-15 permettent d'attribuer la configuration *E* au groupement éthylidène.

La configuration relative de cette unité dihydropleiocarpamine chlorée a été déterminée comme étant 2*R**, 3*S**, 4*S**, 7*S**, 15*S**, 16*S**.

Comme on peut l'observer sur la Figure 134 ci-dessous, les courbes de DC des goniomedines A (**128**) et E (**132**) sont superposables. De plus, ces composés appartenant à la même série chimique, on peut donc aisément extrapoler le résultat obtenu pour la goniomedine A à la goniomedine E en lui assignant la configuration absolue ; 2*R*, 3*S*, 4*S*, 7*S*, 15*S*, 16*S*, 2'*S*, 4'*S*, 7'*R*, 20'*R*.

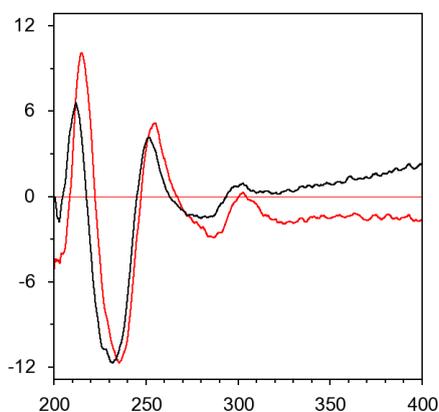


Figure 134. Comparaison des spectres de DC de la goniomedine A (rouge) et de la goniomedine E (noir)

2.3 Biosynthèse des goniomedines

Les étapes qui nous ont permis de déterminer la configuration absolue de la goniomedine A, ont révélé sa nature artificielle. Cette observation nous a conduit à nous intéresser à la voie de biosynthèse de la goniomedine B (**129**) et plus précisément à sa forme déprotonée (**142**), considérée comme la molécule précurseur de toutes les goniomedines.

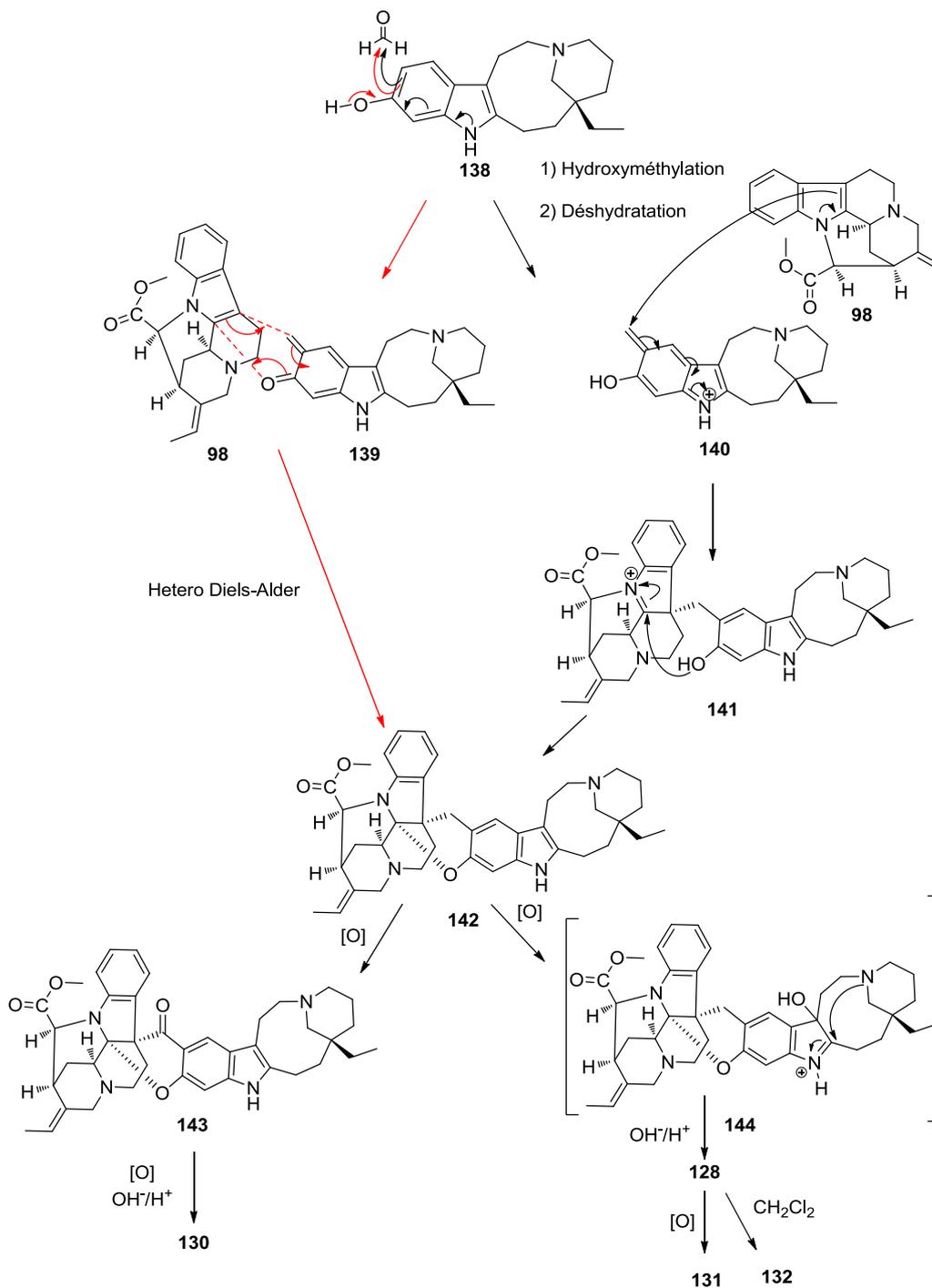


Figure 135. Hypothèse biosynthétique des goniomedines

L'hypothèse biosynthétique de la formation des goniomedines est illustrée dans la Figure 135. La séquence est initiée par une réaction d'hydroxyméthylation de la (-)-11-hydroxyquebrachamine (**138**) avec le formaldéhyde (comme dans le cas de la pycnanthine¹⁷⁴ ou le voacinol¹⁷⁹), dont la présence pourrait s'expliquer par des réactions de dégradation microbienne.¹⁹⁴ A l'issue de cette réaction d'hydroxyméthylation-déshydratation, deux entités peuvent être obtenues : l'ortho méthylène-quinone (**139**) et l'ortho méthylène-phénol (**140**). Ces dernières peuvent participer à deux types de réaction avant d'aboutir à la forme déprotonée de la goniomedine B (**142**) :

- L'ortho méthylène-quinone (**139**) peut participer à une cycloaddition [4+2] d'après un mécanisme concerté d'hétéro Diels-Alder (DA) (en rouge) avec la pleiocarpamine (**98**) à l'origine du cycle dihydropyrane. Il faut noter que les stéréochimies du diène (**139**) et du diénophile (**98**) sont conservées durant la réaction de DA.
- L'ortho méthylène-phénol (**140**), quant à lui, subirait l'attaque nucléophile de la pleiocarpamine (**98**) pour aboutir à l'hétérodimère (**141**) qui subit une cyclisation suite à l'attaque nucléophile intramoléculaire de l'anion phénate sur le carbone C-2.

Ensuite, comme il a été décrit précédemment, la forme base de la goniomedine B (**142**) passera de l'état quebrachamine à l'état rhazidine pour donner la goniomedine A (**128**) et cela après une oxydation spontanée sous l'effet de l'oxygène de l'air¹⁹⁵⁻¹⁹⁶⁻¹⁹⁷ aboutissant à l'hydroxyindolénine **144**, et d'une cyclisation suite au traitement acido-basique lors de l'extraction alcaloïdique.

La goniomedine C (**130**) proviendrait de l'oxydation de la forme déprotonée de la goniomedine B (**142**) aboutissant à l'intermédiaire **143** qui subirait, par la suite, les mêmes réarrangements de sa partie quebrachamine pour passer à l'état rhazidine.

La goniomedine D (**131**) proviendrait de la suroxydation de la goniomedine A (**128**).

Enfin la goniomedine E (**132**) provient probablement de la quaternarisation de l'amine tertiaire (N-4) de la goniomedine A (**128**) sous l'effet du chlorure de méthylène.¹⁸²

¹⁹⁴ Dewick, P. M. dans: *Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach 3rd Edition*, 2009, 163-165

¹⁹⁵ Beer, R. J. S. et al. *J. Chem. Soc.* **1952**, 4946-4951.

¹⁹⁶ Campaigne, E. et al. *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 478-487.

¹⁹⁷ Hootele, C. et al. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1967**, *76*, 300-307.

2.4 Activités biologiques

2.4.1 Activités antiplasmodiale et cytotoxique des composés isolés de *G. malagasy*

Les 15 fractions issues du fractionnement de l'extrait alcaloïdique des écorces de *Gonioma malagasy* ont été soumises à une évaluation antiplasmodiale à la concentration de 10 µg/mL. Les résultats de cette évaluation montrent que les fractions (F.4-F.10) sont les seules à inhiber la croissance du parasite avec 100 % d'inhibition à 10 µg/mL (Tableau VIII).

Tableau VIII. Activité biologique des 15 fractions de *G. malagasy* sur FcB1 à 10 µg/mL

Fraction	F.1	F.2	F.3	F.4	F.5	F.6	F.7	F.8	F.9	F.10	F.11	F.12	F.13	F.14	F.15
% d'inhibition FcB1 10 µg/mL	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0

L'activité biologique de l'ensemble des composés isolés des écorces de *G. malagasy* a été évaluée vis-à-vis du *P. falciparum* (*in vitro*). En parallèle, la cytotoxicité de ces produits est évaluée sur des lignées cellulaires cancéreuse (KB) et saine (MRC-5).

L'ensemble de ces résultats est présenté dans le Tableau IX ci-dessous :

Tableau IX. Activités antiplasmodiale et cytotoxique des composés isolés de *G. malagasy*

Composés	<i>P. falciparum</i> souche FcB1 ^a	KB ^a	MRC-5 ^a
128	>15	>15	>15
129	2,5 ± 0,2	9,19 ± 1,08	8,78 ± 1,41
130	>14	>14	>14
131	>14	>14	>14
132	>14	>14	>14
133	>35	>35	>35
134	>28	>28	>28
98	>31	4,86 ± 1,16	4,08 ± 0,23
Chloroquine	0,05 ± 0,02	-	-
Taxotere	0,005 ± 0,001	0,00016	31,5

^a Activité biologique exprimée en CI₅₀ ± DS µM

A la lecture de ce tableau, on peut émettre plusieurs observations quant à l'activité biologique des alcaloïdes isolés

- La première est la très faible toxicité de ces produits sur lignées cellulaires saines et cancéreuses, à l'exception de la goniomedine B (129) et de la (+)-pleiocarpamine (98)

- On notera aussi, que la goniomedine B est la seule à avoir montré une activité antiplasmodiale, même si cette dernière reste corrélée à une cytotoxicité réduisant son indice de sélectivité.

Curieusement, le fractionnement bioguidé de l'extrait alcaloïdique des écorces de *G. malagasy* n'a pas conduit à l'isolement de composés possédant une activité antiplasmodiale. Il est fort probable que la forte activité de l'extrait soit imputable à la présence de composés qui n'ont pas été isolés pendant cette étude. En effet, la pleiomutinine (**80**), un bisindole qui a été isolé des feuilles de *G. malagasy*,¹⁴⁹ a montré une activité antiplasmodiale intéressante lors d'une enquête ethnopharmacologique effectuée au Ghana.¹⁵⁶ En revanche, malgré nos efforts, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de ce composé au sein des extraits étudiés.

3-Conclusion de la partie III

L'étude phytochimique de *Gonioma malagasy* a conduit à l'isolement d'une nouvelle série de molécules que nous avons nommée "goniomedine" en référence au genre de la plante étudiée.

Cette série représente une nouvelle classe d'alcaloïde bisindolique. En effet, il s'agit du premier exemple de bisindole constitué d'une unité pleiocarpamine et d'une unité quebrachamine ou rhazidine (voir Étude bibliographique). De plus, ces bisindoles possèdent une structure originale dans laquelle les deux unités dihydroindoliques sont fusionnées via un cycle dihydropyrane.

L'activité antiplasmodiale de l'extrait alcaloïdique des écorces est probablement due à la présence de composés qui n'ont pas été isolés ou alors à un effet de synergie qui mériterait d'être élucidé dans une étude ultérieure.

La configuration absolue des goniomedines a été déduite par la comparaison des spectres de dichroïsme circulaire théoriques et expérimentaux d'une part, et grâce à des considérations biosynthétiques d'autre part. Cette étude structurale nous a permis de mettre en évidence la nature artefactuelle des goniomedines issues de l'extrait alcaloïdique. Une hypothèse biogénétique a été également proposée. Elle justifie la stéréochimie et la formation des différentes goniomedines. Enfin, une activité antiplasmodiale a été mise en évidence au niveau de la goniomedine B retrouvée dans l'extrait éthanolique.

Conclusion générale

Ce travail de thèse avait pour objectif de découvrir de nouveaux composés à activité antiplasmodiale. Les criblages préliminaires sur la souche FcB1 ainsi que sur KB et MRC5, ont permis de sélectionner 11 espèces. Parmi elles, nous avons choisi d'étudier l'espèce *Pyrostria major* (Rubiaceae) et l'espèce *Gonioma malagasy* (Apocynaceae). Leurs extraits AcOEt et alcaloïdique ont montré une des meilleures activités antiplasmodiales (99 % à 10 µg/mL). Bien qu'ayant déjà fait l'objet de 3 publications, l'espèce *Gonioma malagasy* a également été sélectionnée pour des critères structuraux intéressants, compte tenu des composés qui ont déjà été isolés à partir de cette plante.

L'étude phytochimique des feuilles de *Pyrostria major* a conduit à l'isolement de huit nouveaux diarylheptanoïdes glycosylés (**54-61**), décrits pour la première fois dans une plante appartenant à la famille des Rubiaceae.

L'activité antiplasmodiale de l'extrait AcOEt des feuilles est probablement due à la présence du β sitostérol. Cette activité serait due à l'effet stomatocytogénique provoqué par cette famille de composés. Bien entendu, seule une observation au microscope électronique à transmission pourrait valider cette hypothèse.

Pour déterminer la configuration absolue des diarylheptanoïdes glycosylés naturels, nous avons utilisé la méthode de l'"Exciton chirality" sur leurs dérivés modifiés. Parmi les composés obtenus, deux (**69-70**) sont des antiplasmodiaux sélectifs et non cytotoxiques et deux autres (**66 - 59**) possèdent une activité antileishmanienne et antitrypanosomale, respectivement. Des études de chimie médicinale pourraient être envisagées à partir de ces "hits" avec l'objectif de trouver des molécules très actives sur les différents protozoaires et dont le coût de fabrication serait raisonnable.

Finalement, les critères que nous nous étions fixés au départ de cette première étude (recherche d'une activité antiplasmodiale sans cytotoxicité), ne nous ont pas permis d'identifier, directement, des composés actifs. En effet, les composés à activité antiplasmodiale identifiés à la suite de ce travail, à l'exception du β sitostérol, ont tous été obtenus à l'issue d'une étude structurale visant à déterminer la stéréochimie des composés isolés. Néanmoins, les efforts fournis lors de ces études structurales ont été couronnés par un apprentissage de nouvelles techniques, confirmant le rôle fondamental de la formation par la recherche.

L'étude phytochimique de *Gonioma malagasy*, quant à elle, a conduit à l'isolement d'une nouvelle série de molécules bisindoliques (**128-132**), "les goniomedines". Cette série représente une nouvelle classe d'alcaloïde bisindolique. En effet, il s'agit du premier exemple de bisindole constitué d'une unité pleiocarpamine et d'une unité quebrachamine ou rhazidine. De plus, ces

bisindoles possèdent une structure originale dans laquelle les deux unités dihydroindoliques sont fusionnées via un cycle dihydropyrane.

Une hypothèse biogénétique a été également proposée. Elle justifie la stéréochimie et la formation des différentes goniomedines. Enfin, une activité antiplasmodiale a été mise en évidence au niveau de la goniomedine B retrouvée dans l'extrait éthanolique, même si cette dernière reste corrélée à une activité cytotoxique.

La configuration absolue des goniomedines a été déduite par la comparaison des spectres de dichroïsme circulaire théoriques et expérimentaux d'une part, et grâce à des considérations biosynthétiques d'autre part. Cette étude nous a permis de mettre en évidence la nature artefactuelle de certaines goniomedines issues de l'extrait alcaloïdique. Elle souligne également les limites des techniques de calcul de spectres de DC théoriques, quand il s'agit de discriminer des diastéréoisomères. Cela est particulièrement vrai, lorsque ces derniers présentent des centres chiraux éloignés des chromophores responsables du phénomène de DC, comme dans le cas de la rhazidine. Néanmoins, il serait intéressant de voir si le dichroïsme circulaire vibrationnel (DCV) ne pourrait pas compléter avantageusement l'étude par le DCE. Le DCV est une technique spectroscopique pouvant s'affranchir de la présence de chromophore dans les molécules étudiées. Elle connaît aujourd'hui un large succès, marqué par le nombre croissant des travaux qui y font référence.

Par ailleurs, il faut noter que plusieurs expériences visant à déterminer la stéréochimie de la goniomedine A ont été effectuées à la faculté des sciences d'Orsay dans l'équipe de RMN en milieu orienté (Équipe du Pr. Denis Merlet). En effet, au début de l'étude, étant dans l'incapacité d'attribuer une configuration relative à la goniomedine A par RMN en milieu isotrope, nous nous sommes tournés vers le milieu anisotrope. Ce milieu permet de déterminer une constante physique supplémentaire appelée le couplage dipolaire résiduel. La détermination de ces couplages permet d'apprécier la distance entre noyaux ainsi que la forme géométrique de la molécule au sein du milieu. Malgré de multiples tentatives, cette technique n'a pas permis d'attribuer la configuration relative de la goniomedine A. En effet, les caractéristiques physico-chimiques de la goniomedine A (forme, solubilité, etc..) sont incompatibles avec cette méthode.

La recherche de composés à activité antiplasmodiale à partir d'extraits de plantes est une approche assez complexe. En effet, les nombreux travaux publiés à l'heure actuelle dans cette thématique, montrent que l'activité biologique de l'extrait brut est souvent plus élevée que l'activité des composés isolés. De plus, l'activité biologique décrite est souvent corrélée à une activité cytotoxique réduisant ainsi l'indice de sélectivité des composés. Enfin, même si l'opinion

Conclusion générale

actuelle favorise l'utilisation du criblage cellulaire par rapport au criblage enzymatique lors de l'investigation des chimiothèques, ce seul critère ne nous semble pas adapté au criblage d'extraits de plantes. Pour ces derniers, nous pensons qu'il est impératif d'adopter une approche combinant tests cellulaires avec contrôles microscopiques et tests sur cibles protéiques.

Quatrième partie
IV-Partie Expérimentale

1-Procédures générales

1.1 Solvants et réactifs

Des solvants (SDS) de pureté 99% ont été utilisés pour les extractions et les premiers fractionnements, puis des solvants de qualité HPLC ou 100 % (SDS) pour les séparations ultérieures. L'eau employée lors des séparations CLHP est de l'eau milliQ re-filtrée le jour de la manipulation au laboratoire avec l'appareil Millipore® Simplicity 185.

1.2 Fractionnements, purifications et suivi des réactions

1.2.1 Chromatographie sur couches minces (CCM)

Les fractions issues des différentes séparations chromatographiques et des réactions ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice 60 F254 de 0,2 mm d'épaisseur sur support d'aluminium (SDS). Les plaques ont été visualisées dans un premier temps sous UV (à 254 et 366 nm) avant d'être révélées par pulvérisation d'un révélateur avec ou sans chauffage.

Deux révélateurs ont principalement été employés :

- Réactif à l'acide sulfomolybdique (10 g de molybdate d'ammonium dans 900 mL d'eau + 100 mL d'acide sulfurique)
- Dragendorff (1,7 g de nitrate de bismuth et 20 mL d'acide acétique dans 80 mL d'eau + 72 g d'iodure de potassium dans 180 mL d'eau)

1.2.2 Chromatographie sur colonne (CC)

Les séparations chromatographiques sur colonne (CC) ont été effectuées à moyenne ou haute pression. Les CC ont été réalisées soit dans des colonnes en verre de différents diamètres en utilisant de la LH-20 Sephadex (SDS), de la silice de granulométrie fine (6-35 μm) ou de l'alumine activée neutre où l'éluant est poussé par de l'air comprimé (3 bar).

1.2.3 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

1.2.3.1 CLHP en phase inverse

Les chromatographies haute performance (CLHP) en phase inverse, analytiques et préparatives ont été réalisées sur 2 appareils :

- Une chaîne Alliance Waters 2695
- Une chaîne Waters autopurification system (Waters 2767 Sample Manager) équipée d'une pompe binaire (Waters 2525). Ces deux appareils sont munis d'un détecteur à barrette de diode (190-600 nm, Waters 2996) et d'un détecteur à diffusion de lumière DEDL (Polymer Laboratories PL-ELS 1000), et sont contrôlés par le logiciel MassLynx.

Les produits ont été élués avec des mélanges H₂O/MeOH en utilisant 0,1% d'acide formique ou de l'acide trifluoroacétique sur plusieurs types de colonnes :

- Colonne C₁₈ Thermohypersil Kromasil[®] analytique (5 µm, 4,6 x 250 mm), semi-préparative (5 µm, 10 x 250 mm) et préparative (5 µm, 21,2 x 250 mm)
- Colonne C₁₈ Sunfire[®] Waters analytique (5 µm, 4,6 x 150 mm) et préparative (5 µm, 19 x 150 mm).

1.2.3.2 CLHP-SM

Les analyses CLHP-MS ont été réalisées sur un appareil constitué de :

- Une chaîne Alliance Waters 2695 munie d'un détecteur à barrette de diode (190-600 nm, Waters 2996) et d'un détecteur à diffusion de lumière DEDL (Waters 2424) et sont contrôlés par le logiciel Empower.
- Un spectromètre quadripôle ZQ 2000 Waters.

1.2.3.3 SFC

La caractérisation du sucre des diarylheptanoïdes a été réalisée par chromatographie Super Critique (SFC) en utilisant l'appareil Thar[®] SFC, muni d'un four Analytical-2-prep Oven, d'une pompe à 4 voies, d'un collecteur et de deux détecteurs : détecteurs Waters 2998 (Photodiode array) et 2424 (ELS). Il est contrôlé par le logiciel SuperChrom.

Le sucre a été élué dans les conditions suivantes :

- Colonne chiralpack analytique IA (5 μm , 4,6 x 250 mm, Daicel Chemical industries)
- Co-solvant (%) : MeOH (12 %) ; Débit de CO_2 : 3,52 mL min^{-1} ; Débit de Co-solvant: 0,48 mL min^{-1} ; Débit total: 4 mL min^{-1} .

1.3 Analyses physiques et spectrales des composés

1.3.1 Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Jasco P1010 (logiciel Spectro Manager) ou d'un polarimètre Anton Paar MCP200. La source lumineuse monochromatique est la raie D du sodium. Les expériences ont été réalisées avec une cuve de 10 cm ou 1 cm et les composés solubilisés dans le méthanol ou le chloroforme.

1.3.2 Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un spectropolarimètre Jasco J-810 (logiciel Spectro Manager). Les expériences ont été réalisées dans le méthanol ou l'éthanol dans une cuve en quartz de 1 cm, à température ambiante.

1.3.3 Spectrométrie ultra-violet (UV)

Les spectres d'absorption UV ont été mesurés dans une cuve en quartz de 1 cm, avec un spectromètre Varian Cary 100 Scan équipé du logiciel CaryWing (programme Scan). Les composés ont été solubilisés dans le méthanol ou le chloroforme.

1.3.4 Spectrométrie infra-rouge (IR)

Les spectres d'absorption IR ont été mesurés avec un spectromètre Perkin Elmer Spectrum BX. L'appareil est équipé du logiciel Spectrum (version 6.3.5) de Perkin Elmer. Les composés ont été préparés en solution dans le chloroforme ou le méthanol puis séchés à l'air comprimé. Les bandes d'absorption sont données en cm^{-1} .

1.3.5 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse haute résolution ESI (Electro Spray Ionisation) ont été réalisés sur un spectromètre à trappe d'ion Thermoquest TLM LCQ en bypass. Soit en UPLC-MS, chaîne UPLC (Acquity, Waters) (colonne BE C₁₈, 1.0 x 50 mm, 1.7 μm) couplée à un spectromètre de masse ESI TOF (LCT premier XE) et à un détecteur UV PDA (Acquity, Waters).

1.3.6 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Tableau X. Références utilisées pour les déplacements chimiques

Solvant	δ_C (ppm) (multiplicité)	δ_H (ppm) (multiplicité)
CDCl ₃ - <i>d</i>	77.23 (3)	7.24 (1)
CD ₃ OD- <i>d</i> ₄	49.15 (7)	4.78 (1) 3.31 (5)
DMF - <i>d</i> ₇	163.15 (3) 34.89 (7) 29.76 (7)	8.03 (1) 2.92 (5) 2.75 (5)

Les expériences de résonance magnétique nucléaire ont été réalisées sur des appareils Bruker Avance 300, 500 ou 600 MHz en utilisant le chloroforme-*d*, le méthanol-*d*₄ ou le N, N-diméthylformamide-*d*₇ (SDS) comme solvant. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million) et calibrés par rapport au solvant pris comme référence interne. Les valeurs des δ des solvants sont celles publiées par Cambridge Isotope Laboratories, Inc. et rapportées dans le Tableau X. Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est donnée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), q (quadruplet), qt (quintuplet) et br pour large (*broad*). L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectuée à partir des expériences 1D ¹H, ¹³C et DEPT-135, associées aux expériences 2D ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹H NOESY ou ROESY, ¹H-¹³C HSQC ou HMQC, ¹H-¹³C HMBC, en utilisant le logiciel NMR NoteBook®.

1.4 Calculs théoriques et génération des courbes de DC

Les conformères sont générés par la méthode de recherche aléatoire Monte-Carlo.¹⁹⁸ L'optimisation de la géométrie des conformères se fait par mécanique moléculaire avec la méthode Polak-Ribière Conjugated Gradient (PRCG)¹⁹⁹ et le champ de force MM2²⁰⁰ dans l'eau par GB/SA.²⁰¹ Les calculs de mécanique moléculaire se font sur le logiciel MacroModel (V 5.5).²⁰² Les calculs de mécanique quantique menés sur les conformères sélectionnés se font par la méthode 'TDDFT' au niveau B3LYP/6-31 G(d,p).^{203,204} Ces calculs sont effectués sur le logiciel *Gaussian09*.²⁰⁵

La génération des courbes de DC se fait sur le logiciel SpecDis (V 1.51).²⁰⁶

¹⁹⁸ Chang, G. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379-4386.

¹⁹⁹ Polak, E. et al. *Rev. Fr. Inf. Rech. Oper.* **1969**, *16*, 35-43.

²⁰⁰ Allinger, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127-8134.

²⁰¹ Still, W. C. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127-6129.

²⁰² Mohamadi, F. et al. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440-467.

²⁰³ Lee, C. et al. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.

²⁰⁴ Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.

²⁰⁵ Frisch, M. J. et al. *Gaussian 09*, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.

²⁰⁶ Bruhn, T. et al. *SpecDis Version 1.51* **2010**,

2-Extractions, isollements et purifications

2.1 *Pyrostria major* Cavaco.

Les feuilles broyées et séchées (375 g) de *Pyrostria major* Cavaco. (MAD-0086) ont été extraites par l'AcOEt (3 x 2 L) suivi par le MeOH (3 x 2 L) à 40 °C. 13 grammes d'extrait acétate d'éthyle et 53 grammes d'extrait méthanolique ont été obtenus.

Dix grammes de l'extrait AcOEt ont été soumis à une CC sur gel de silice en utilisant un gradient DCM : MeOH (100 : 0 à 80 : 20) de polarité croissante, conduisant à 16 fractions (**F.1-F.16**), qui ont été regroupées sur la base de leurs profils CCM.

La fraction **F.5** (63,2 mg) s'est avérée contenir du β -sitostérol.

La fraction **F.15** (200 mg) a été soumise à une CLHP préparative sur une phase C₁₈ Kromasil® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (60 : 40 à 100 : 0 + 0,1 % d'acide formique) à 21 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir le composé **1** (80 mg, 6,2 x 10⁻⁶ %), **2** (50 mg, 2,7 x 10⁻⁶ %) et le composé **5** (4 mg, 7 x 10⁻⁷ %).

La fraction **F.16** (400 mg) a été soumise à une CLHP préparative, sur une phase C₁₈ Kromasil® en utilisant gradient MeOH : H₂O (40 : 60 à 70 : 30 + 0,1 % d'acide formique) pendant 20 minutes à un débit de 21 mL min⁻¹, pour conduire à l'obtention du composé **3** (30 mg, 5,2 x 10⁻⁶ %), du composé **4** (20 mg, 3,87x 10⁻⁶ %), du composé **6** (2 mg, 3,4 x 10⁻⁷ %), du composé **7** (2 mg, 3,4 x 10⁻⁷ %) et du composé **8** (2 mg, 3,4 x 10⁻⁷ %).

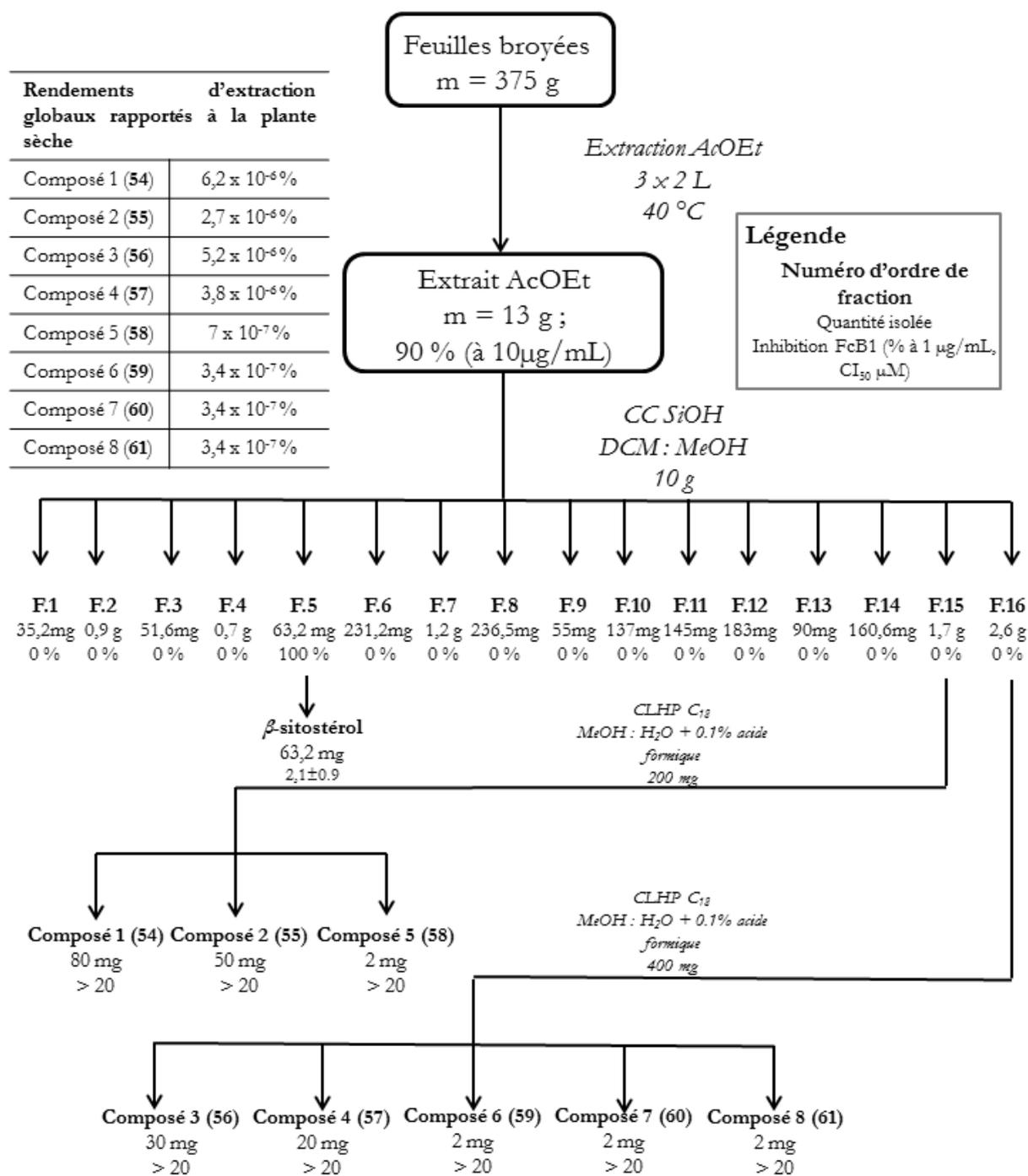


Figure 136. Schéma d'extraction des composés isolés des feuilles de *Pyrostria major* et activités biologiques vis à vis du *Plasmodium falciparum* (exprimées en % d'inhibition à 1 µg/mL et CI₅₀ µM)

2.2 *Gonioma malagasy* Boiteau

2.2.1 Extrait d'écorces

Dans un premier temps, 250 g d'écorces broyées de *Gonioma malagasy* (récolte MAD-0161) ont été extraits selon l'extraction classique des alcaloïdes, conduisant à 1,2 g ($\rho = 0,48$ % p/p) d'extraits d'alcaloïdes totaux. L'extrait alcaloïdique (1,2 g) a été soumis à une CC sur gel d'alumine en utilisant un gradient DCM : MeOH (100 : 0 à 80 : 20) de polarité croissante, conduisant à 15 fractions (**F.1-F.15**), qui ont été regroupées sur la base de leurs profils CCM.

La fraction **F.4** (29,4 mg) a été soumise à une CLHP préparative sur une phase C₁₈ Sunfire® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % d'acide trifluoroacétique, TFA) à 21 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir la (+) aspidofractinine (**133**) (10 mg, 0,004 %).

La fraction **F.5** (57 mg) a été soumise à une CLHP préparative sur une phase C₁₈ Kromasil® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % TFA) à 21 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir l'akuammidine (**134**) (12 mg, 0,004 %).

La fraction **F.8** (314 mg) a été soumise à une CLHP préparative sur une phase C₁₈ Sunfire® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % TFA) à 21 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir sept fractions (**F^{8.1}-F^{8.7}**). La fraction **F^{8.5}** correspond à la goniomedine E (**132**) (15 mg). La fraction **F^{8.6}** (214 mg) a été soumise à une CLHP préparative sur une phase C₁₈ Sunfire® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % TFA) à 21 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir six fractions (**F^{8.6.1}-F^{8.6.6}**). La fraction **F^{8.6.3}** (6,7 mg) a été soumise à une CLHP semi-préparative sur une phase C₁₈ Kromasil® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % TFA) à 4,7 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir la (+)-pleiocarpamine (**98**) (3,5 mg, 0,001 %). La fraction **F^{8.6.4}** correspond à la goniomedine A (**128**) (110 mg). La fraction **F^{8.6.5}** (4,3 mg) a été soumise à une CLHP semi-préparative sur une phase C₁₈ Kromasil® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % TFA) à 4,7 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir la goniomedine C (**130**) (3 mg, 0,001 %).

La fraction **F.9** (157 mg) a été soumise à une CLHP préparative sur une phase C₁₈ Sunfire® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % TFA) à 21 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir la goniomedine E (**132**) (8 mg).

La fraction **F.10** (150 mg) a été soumise à une CLHP préparative sur une phase C₁₈ Sunfire® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % TFA) à 21 mL min⁻¹

pendant 20 minutes, pour obtenir la goniomedine E (**132**) (50 mg) et la goniomedine D (**131**) (9 mg, 0,003 %).

Dans un second temps, les écorces broyées et séchées (250 g) de *Gonioma malagasy* Boiteau. (MAD-0161) ont été extraites par l'EtOH (3 x 1 L) à 40 °C conduisant à 8 g d'extrait EtOH. 300 mg de cet extrait ont été soumis à une CLHP préparative sur une phase C₁₈. Sunfire® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % TFA) à 21 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir la goniomedine B (**129**) (10 mg, 0,1 %).

2.2.2 Extrait de feuilles

Les feuilles séchées et pulvérisées ont été extraites, après alcalinisation par une solution d'ammoniaque, par l'AcOEt dans un appareil de Soxhlet. Le rendement en alcaloïdes totaux est de 2 %.

L'extrait alcaloïdique (8 g) des feuilles de *G. malagasy* a été soumis à une colonne ouverte de Sephadex LH-20 (CC) élué par du MeOH. Sept fractions (**F.1-F.7**) ont été obtenues et rassemblées en fonction de leurs profils en chromatographie sur couche mince (CCM). Dans le but de mettre en évidence le monomère manquant (la (-)-quebrachamine (**76**)), les sept fractions ont été analysées par CL/SM. La (-)-quebrachamine (**76**) a été détectée au sein de la fraction **F.5** (71 mg). Cette fraction a été soumise à une CLHP préparative sur une phase C₁₈. Sunfire® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % TFA) à 21 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir 6 fractions (**F^{5.1}-F^{5.6}**). La fraction **F^{5.5}** (6 mg) a été soumise à une CLHP semi-préparative sur une phase C₁₈. Kromasil® en utilisant un gradient MeOH : H₂O (70 : 30 à 50 : 50 + 0,1 % TFA) à 4,7 mL min⁻¹ pendant 20 minutes, pour obtenir la (-)-quebrachamine (**76**) (2 mg) (5 x 10⁻⁴).

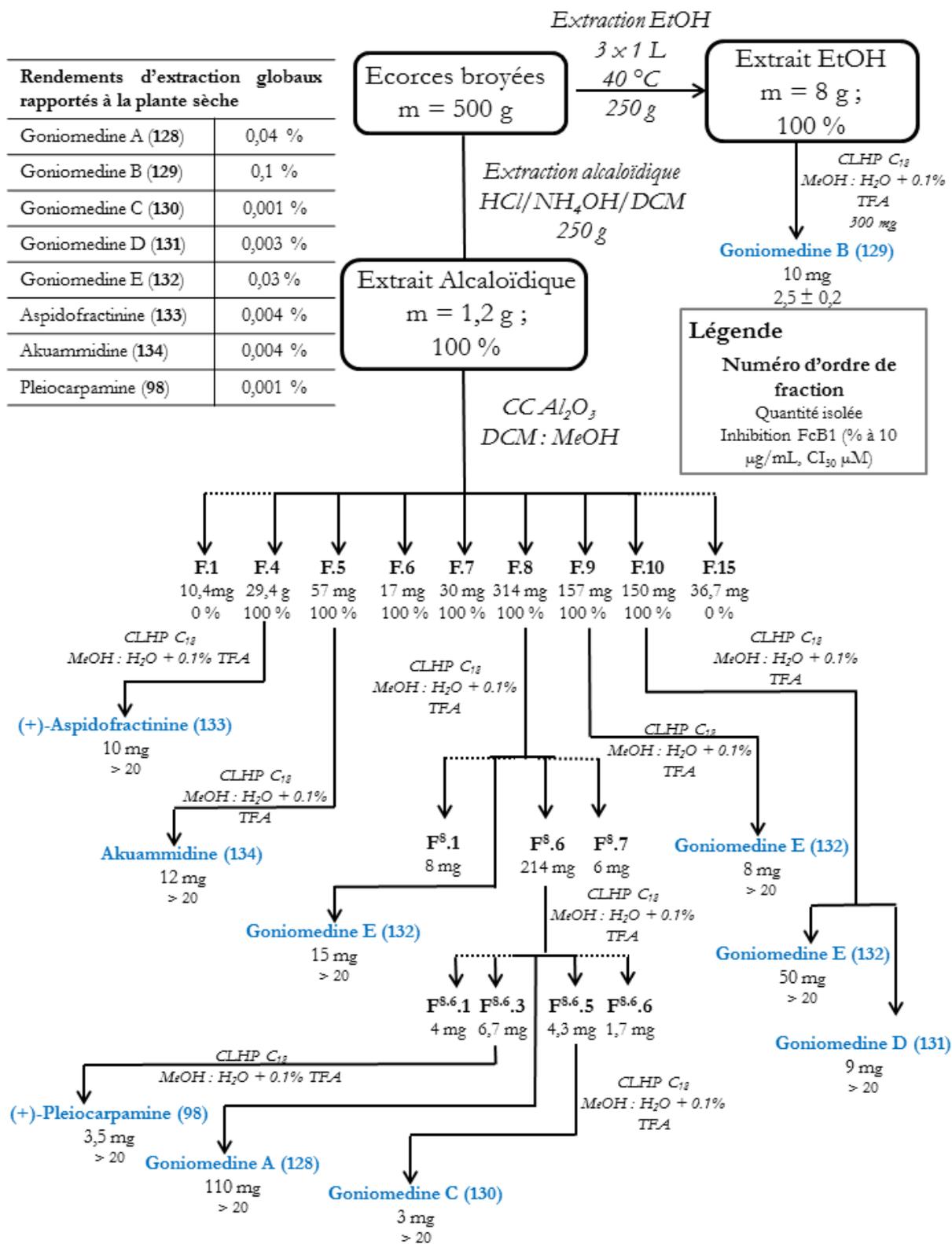


Figure 137. Schéma de fractionnement des écorces de *G. malagasy*

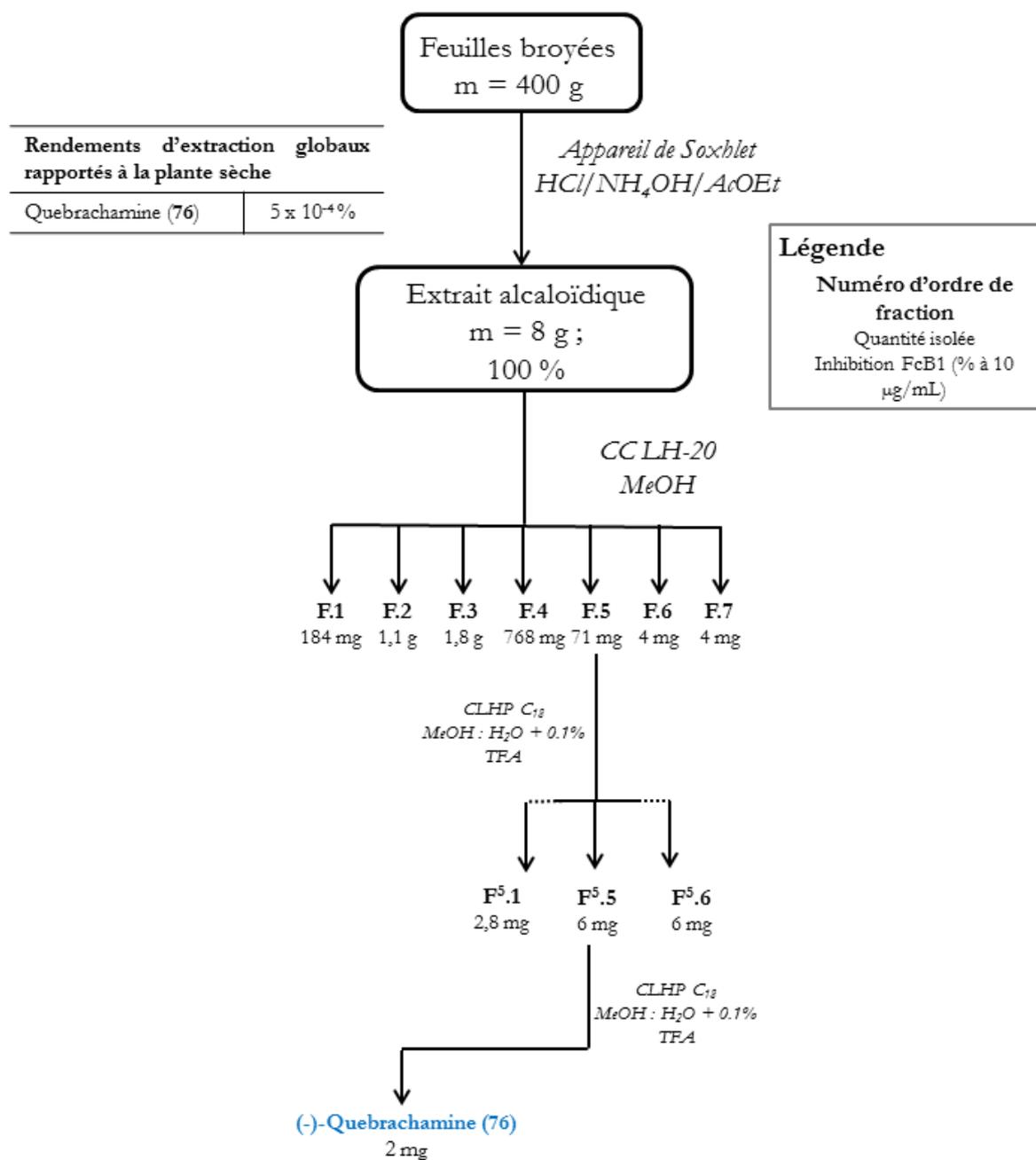


Figure 138. Schéma de fractionnement de l'extrait alcaloïdique des feuilles de *G. malagasy*

3-Caractéristiques physiques et spectrales des produits naturels

3.1 *Pyrostria major* Cavaco.

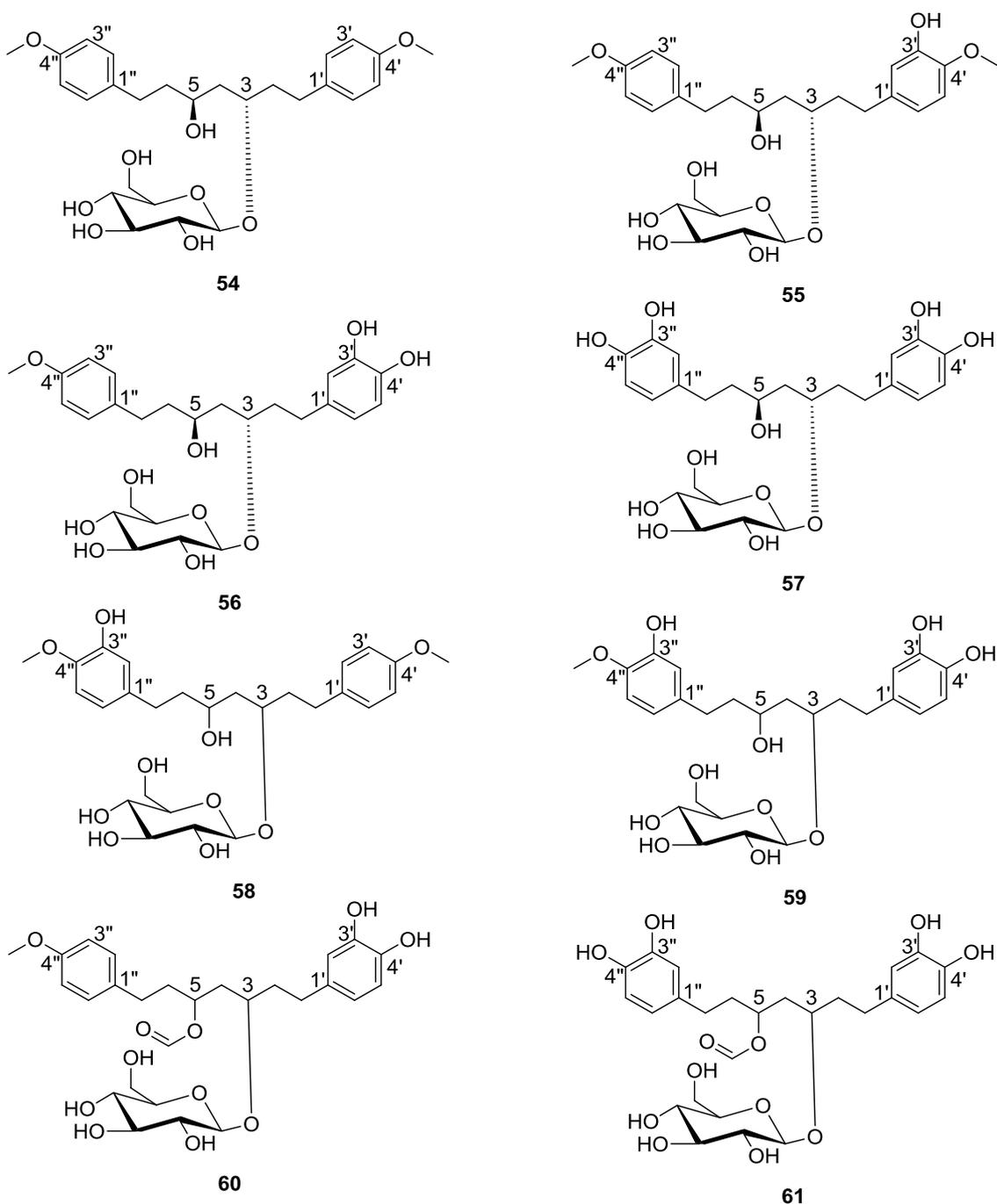
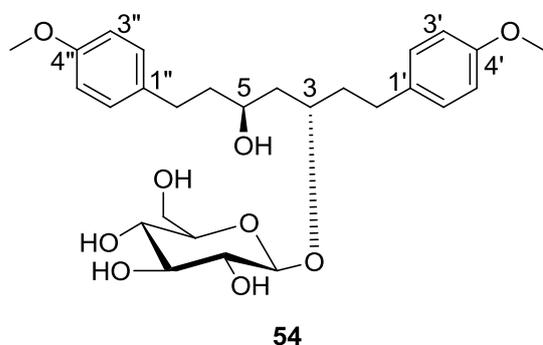


Figure 139. Structures des diarylheptanoïdes glycosylés isolés des feuilles de *Pyrostria major*

Le composé 1 (54)-AB2-73-3

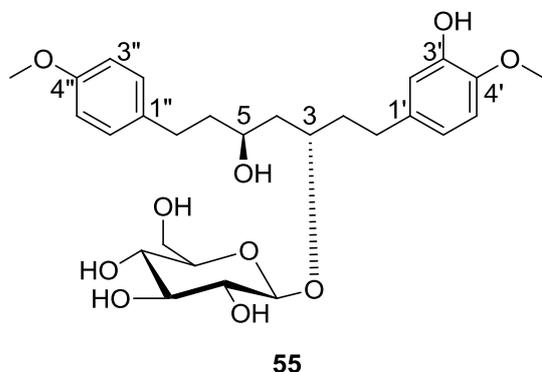
**C₂₇H₃₈O₉****M** = 506,59 g.mol⁻¹**Obtention :**Isolé des feuilles de *Pyrostria major* $\rho = 6,2 \times 10^{-6}$ % p/p**Activités biologiques****FcB1** : non actif à 10 µg/mL**KB** : non actif à 10 µg/mL**HL-60** : non actif à 10 µg/mL**MRC-5** : non actif à 10 µg/mL**L. donovani** non actif à 10 µg/mL**T. brucei** : non actif à 10 µg/mL**Aspect** : solide amorphe incolore**SM-ESIHR**: [M + Na]⁺ $m/z = 529,2406$ (calculée pour C₂₇H₃₈O₉Na, 529,2414)**UV**, λ_{\max} (MeOH) (log ϵ) : 224 nm (4,36) ; 278 nm (3,6)**IR**, ν_{\max} en cm⁻¹: 1634, 1512, 1244, 1078, 710, 2155, 3220.**[\alpha]_D** : - 39 (*c* 0,05, MeOH).**RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :**

δ (ppm) : 1,61-1,75 (4H, m, H₂-4, H₂-6) ; 1,79 (1H, m, H-2a) ; 1,93 (1H, m, H-2b) ; 2,56 (1H, m, H-7a) ; 2,64 (2H, t, *J* = 8,5 Hz, H₂-1) ; 2,68 (1H, m, H-7b) ; 3,19 (1H, t, *J* = 8,5 Hz, Glc-2) ; 3,26 (1H, m, Glc-5) ; 3,33 (1H, m, Glc-4) ; 3,34 (1H, m, Glc-3) ; 3,71 (1H, *dd*, *J* = 11,8, 5,5 Hz, Glc-6a) ; 3,74 (3H, *s*, OMe) ; 3,75 (3H, *s*, OMe) ; 3,87 (1H, *dd*, *J* = 11,8, 2,7 Hz, Glc-6b) ; 3,91 (1H, *m*, H-5) ; 3,96 (1H, *m*, H-3) ; 4,39 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, Glc-1) ; 6,80 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-3', H-5') ; 6,81 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-3'', H-5'') ; 7,09 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-2'', H-6'') ; 7,14 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-2', H-6').

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) :

δ (ppm) : 31,6 (C-1) ; 32,3 (C-7) ; 39,1 (C-2) ; 41,3 (C-6) ; 43,1 (C-4) ; 55,7 (4'-OMe, 4''-OMe) ; 62,9 (Glc-6) ; 68,4 (C-5) ; 71,8 (Glc-4) ; 75,6 (Glc-2) ; 78,0 (Glc-5) ; 78,3 (Glc-3, C-3) ; 104,4 (Glc-1) ; 114,8 (C-3'', C-5'') ; 114,9 (C-3', C-5') ; 130,4 (C-2'', C-6'') ; 130,5 (C-2', C-6') ; 135,8 (C-1'') ; 136,0 (C-1') ; 159,3 (C-4'') ; 159,4 (C-4')

Le composé 2 (55)-AB2-73-2

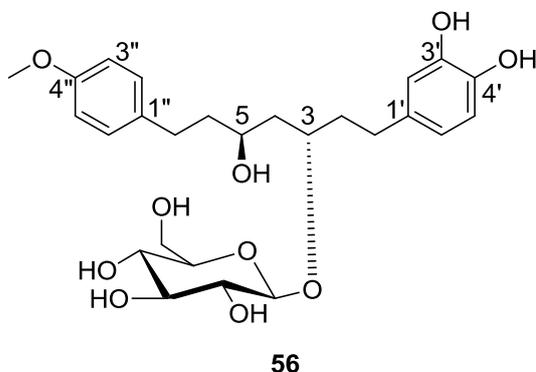
**C₂₇H₃₈O₁₀****M** = 522,58 g.mol⁻¹**Obtention :**Isolé des feuilles de *Pyrostria major* $\rho = 2,7 \times 10^{-6}\%$ p/p**Activités biologiques****FcB1** : non actif à 10 µg/mL**KB** : non actif à 10 µg/mL**HL-60** : non actif à 10 µg/mL**MRC-5** : non actif à 10 µg/mL**L. donovani** : non actif à 10 µg/mL**T. brucei** : non actif à 10 µg/mL**Aspect** : solide amorphe vert**SM-ESIHR** [M + Na]⁺ *m/z* = 545,2410 (calculée pour C₂₇H₃₈O₁₀Na, 545,2363).**UV**, λ_{\max} (MeOH) (log ϵ) : 224 nm (4,3) ; 278 nm (3,7)**IR**, ν_{\max} en cm⁻¹: 3291, 1512, 1432, 1364, 1271, 1232, 1078, 1033, 815.**[α]_D** : -31 (*c* 0,17, MeOH).**RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) :**

δ (ppm) : 1,59-1,74 (4H, *m*, H₂-4, H₂-6) ; 1,75 (1H, *m*, H-2a) ; 1,94 (1H, *m*, H-2b) ; 2,51-2,73 (4H, *m*, H₂-7, H₂-1) ; 3,19 (1H, *t*, *J* = 8,5 Hz, Glc-2) ; 3,26 (1H, *m*, Glc-5) ; 3,33 (1H, *m*, Glc-4) ; 3,35 (1H, *m*, Glc-3) ; 3,71 (1H, *dd*, *J* = 11,8, 5,5 Hz, Glc-6a) ; 3,72 (3H, *s*, OMe-4'') ; 3,78 (3H, *s*, OMe-4') ; 3,87 (1H, *dd*, *J* = 11,8, 2,7 Hz, Glc-6b) ; 3,91 (1H, *m*, H-5) ; 3,96 (1H, *m*, H-3) ; 4,39 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, Glc-1) ; 6,63 (1H, *dd*, *J* = 8,5, 2 Hz, H-6') ; 6,73 (1H, *d*, *J* = 2 Hz, H-2'') ; 6,78 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-5') ; 6,79 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-3'', H-5'') ; 7,07 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-2'', H-6'').

RMN ¹³C (75 MHz, CD₃OD) :

δ (ppm) : 31,8 (C-1) ; 32,2 (C-7) ; 38,9 (C-2) ; 41,2 (C-6) ; 42,9 (C-4) ; 55,7 (4''-OMe) ; 56,6 (4'-OMe) ; 62,9 (Glc-6) ; 68,4 (C-5) ; 71,7 (Glc-4) ; 75,5 (Glc-2) ; 78,0 (Glc-5) ; 78,1 (Glc-3) ; 78,3 (C-3) ; 104,2 (Glc-1) ; 113,0 (C-5'') ; 114,9 (C-3'', C-5'') ; 116,8 (C-2'') ; 120,8 (C-6'') ; 130,4 (C-2'', C-6'') ; 135,8 (C-1'') ; 136,9 (C-1') ; 147,1 (C-4'') ; 147,3 (C-3'') ; 159,3 (C-4'')

Le composé 3 (56)-AB2-83-4

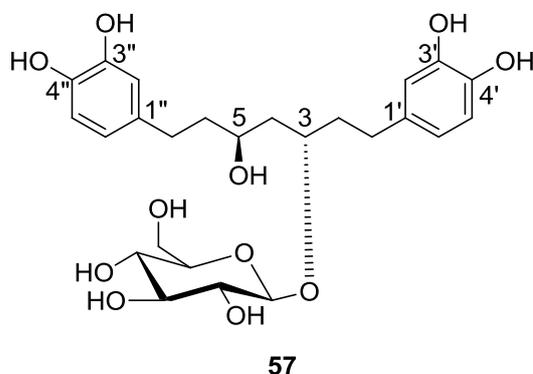
 $C_{26}H_{36}O_{10}$ $M = 508,56 \text{ g.mol}^{-1}$ **Obtention :**Isolé des feuilles de *Pyrostria major* $\rho = 5,2 \times 10^{-6}\%$ p/p**Activités biologiques****FcB1** : non actif**KB** : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$ **HL-60** : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$ **MRC-5** : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$ **L. donovani** : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$ **T. brucei** : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$ **Aspect** : solide amorphe marron.**SM-ESIHR** $[M + Na]^+ m/z = 531,2285$ (calculée pour $C_{26}H_{36}O_{10}Na$, 531,2206).**UV**, λ_{max} (MeOH) ($\log \epsilon$) : 222 nm (4,2), 284 nm (3,6).**IR**, ν_{max} en cm^{-1} : 3291, 1512, 1432, 1364, 1271, 1232, 1078, 1033, 815. $[\alpha]_{\text{D}}$: -10 (c 0,13, MeOH).**RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) :**

δ (ppm) : 1,59-1,72 (4H, *m*, H₂-4, H₂-6) ; 1,75 (1H, *m*, H-2a) ; 1,94 (1H, *m*, H-2b) ; 2,51-2,61 (3H, *m*, H-7a, H₂-1) ; 2,67 (1H, *m*, H-7b) ; 3,20 (1H, *t*, $J = 8,5 \text{ Hz}$, Glc-2) ; 3,30 (1H, *m*, Glc-5) ; 3,33 (1H, *m*, Glc-4) ; 3,36 (1H, *m*, Glc-3) ; 3,71 (1H, *dd*, $J = 11,8, 5,5 \text{ Hz}$, Glc-6a) ; 3,74 (3H, *s*, OMe-4'') ; 3,89 (1H, *dd*, $J = 11,8, 2,7 \text{ Hz}$, Glc-6b) ; 3,90 (1H, *m*, H-5) ; 3,96 (1H, *m*, H-3) ; 4,39 (1H, *d*, $J = 7,8 \text{ Hz}$, Glc-1) ; 6,52 (1H, *dd*, $J = 8, 2 \text{ Hz}$, H-6') ; 6,66 (1H, *d*, $J = 8 \text{ Hz}$, H-5') ; 6,71 (1H, *d*, $J = 2 \text{ Hz}$, H-2') ; 6,81 (2H, *d*, $J = 8,5 \text{ Hz}$, H-3'', H-5'') ; 7,08 (2H, *d*, $J = 8,5 \text{ Hz}$, H-2'', H-6'') .

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) :

δ (ppm) : 31,9 (C-1) ; 32,3 (C-7) ; 39,1 (C-2) ; 41,3 (C-6) ; 43,0 (C-4) ; 55,8 (4''-OMe) ; 62,9 (Glc-6) ; 68,5 (C-5) ; 71,8 (Glc-4) ; 75,6 (Glc-2) ; 78,0 (Glc-5) ; 78,2 (Glc-3) ; 78,4 (C-3) ; 104,3 (Glc-1) ; 114,9 (C-3'', C-5'') ; 116,4 (C-5') ; 116,9 (C-2') ; 120,9 (C-6') ; 130,4 (C-2'', C-6'') ; 135,6 (C-1') ; 135,8 (C-1'') ; 144,2 (C-4') ; 146,1 (C-3') ; 159,4 (C-4'') .

Le composé 4 (57)-AB2-83-1



$$M = 510,53 \text{ g.mol}^{-1}$$

Obtention :

Isolé des feuilles de *Pyrostria major*

$$\rho = 3,87 \times 10^{-6} \% \text{ p/p}$$

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 µg/mL

KB : non actif à 10 µg/mL

HL-60 : non actif à 10 µg/mL

MRC-5 : non actif à 10 µg/mL

L. donovani : non actif à 10 µg/mL

T. brucei : non actif à 10 µg/mL

Aspect : solide amorphe marron.

SM-ESIHR $[M + \text{Na}]^+ m/z = 533,2015$ (calculée pour $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_{11}\text{Na}$, 533,1999).

UV, λ_{max} (MeOH) (log ϵ) : 227 nm (3,6), 281 nm (3,5).

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 1634, 1512, 1244, 1078, 710, 2155, 3220.

$[\alpha]_{\text{D}}$: - 3,76 (c 0,1, MeOH).

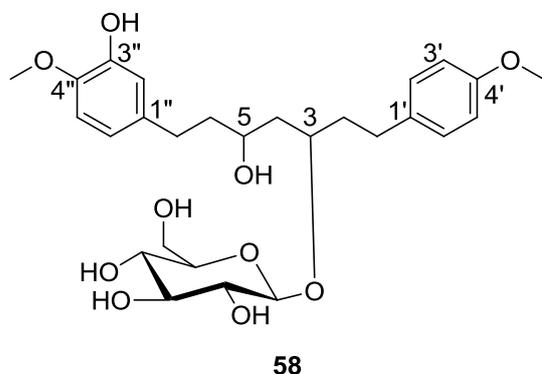
RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) :

δ (ppm) : 1,57-1,81 (5H, *m*, H₂-4, H₂-6, H-2a) ; 1,93 (1H, *m*, H-2b) ; 2,46-2,67 (4H, *m*, H₂-7, H₂-1) ; 3,20 (1H, *t*, $J = 8,5$ Hz, Glc-2) ; 3,28 (1H, *m*, Glc-5) ; 3,33 (1H, *m*, Glc-4) ; 3,37 (1H, *m*, Glc-3) ; 3,71 (1H, *dd*, $J = 11,8, 5,5$ Hz, Glc-6a) ; 3,89 (1H, *dd*, $J = 11,8, 2,7$ Hz, Glc-6b) ; 3,93 (1H, *m*, H-5) ; 3,96 (1H, *m*, H-3) ; 4,39 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, Glc-1) ; 6,50 (1H, *dd*, $J = 8, 2$ Hz, H-6'') ; 6,53 (1H, *dd*, $J = 8, 2$ Hz, H-6') ; 6,63 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H- 2'') ; 6,66 (2H, *d*, $J = 8$ Hz, H-5', H-5'') ; 6,70 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-2') .

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) :

δ (ppm) : 31,8 (C-1) ; 32,5 (C-7) ; 39,1 (C-2) ; 41,3 (C-6) ; 43,0 (C-4) ; 62,9 (Glc-6) ; 68,5 (C-5) ; 71,7 (Glc-4) ; 75,6 (Glc-2) ; 78,0 (Glc-5) ; 78,3 (Glc-3) ; 78,4 (C-3) ; 104,3 (Glc-1) ; 116,4 (C-5'') ; 116,5 (C-5') ; 116,7 (2'') ; 116,9 (2') ; 120,7 (C-6'') ; 120,9 (C-6') ; 135,5 (C-1'') ; 135,6 (C-1') ; 144,2 (C-4'') ; 144,3 (C-4') ; 146,1 (C-3'') ; 146,2 (C-3')

Le composé 5 (58)-AB2-73-1

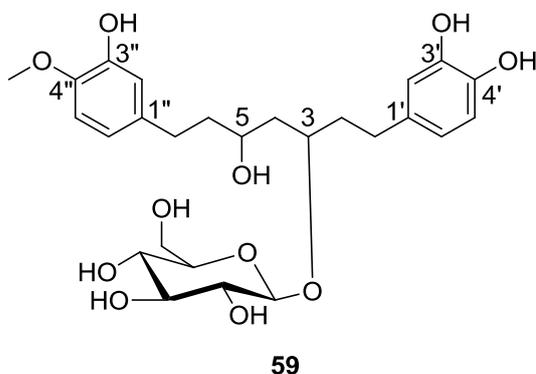
**C₂₇H₃₈O₁₀****M** = 522,58 g.mol⁻¹**Obtention :**Isolé des feuilles de *Pyrostria major* $\rho = 7 \times 10^{-70}$ p/p**Activités biologiques****FcB1** : non actif à 10 µg/mL**KB** : non actif à 10 µg/mL**HL-60** : non actif à 10 µg/mL**MRC-5** : non actif à 10 µg/mL**L. donovani** : non actif à 10 µg/mL**T. brucei** : non actif à 10 µg/mL**Aspect** : solide amorphe marron.**SM-ESIHR** [M + Na]⁺ m/z = 545,2404 (calculée pour C₂₇H₃₈O₁₀Na, 545,2363).**UV**, λ_{\max} (MeOH) (log ϵ) : 223 nm (4,7), 278 nm (3,25).**IR**, ν_{\max} en cm⁻¹: 3291, 1432, 1364, 1271, 1232, 1078, 1033, 815.**[α]_D** : + 5,8 (c 0,05, MeOH).**RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :**

δ (ppm) : 1,60-1,77 (4H, *m*, H₂-4, H₂-6) ; 1,79 (1H, *m*, H-2a) ; 1,94 (1H, *m*, H-2b) ; 2,51 (1H, *m*, H-7a) ; 2,62 (1H, *m*, H-7b) ; 2,64 (2H, *t*, $J = 7,7$ Hz, H₂-1) ; 3,19 (1H, *t*, $J = 8,5$ Hz, Glc-2) ; 3,26 (1H, *m*, Glc-5) ; 3,33 (1H, *m*, Glc-4) ; 3,35 (1H, *m*, Glc-3) ; 3,71 (1H, *dd*, $J = 11,8, 5,5$ Hz, Glc-6a) ; 3,74 (3H, *s*, OMe-4') ; 3,80 (3H, *s*, O-Me-4'') ; 3,87 (1H, *dd*, $J = 11,8, 2,7$ Hz, Glc-6b) ; 3,90 (1H, *m*, H-5) ; 3,95 (1H, *m*, H-3) ; 4,39 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, Glc-1) ; 6,62 (1H, *dd*, $J = 8,5, 2$ Hz, H-6'') ; 6,66 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-2'') ; 6,80 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'') ; 6,81 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-3', H-5') ; 7,12 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-2', H-6') .

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) :

δ (ppm) : 31,6 (C-1) ; 32,5 (C-7) ; 39,2 (C-2) ; 41,2 (C-6) ; 42,0 (C-4) ; 55,7 (4''-OMe) ; 56,6 (4'-OMe) ; 62,9 (Glc-6) ; 68,4 (C-5) ; 71,8 (Glc-4) ; 75,6 (Glc-2) ; 78,0 (Glc-5) ; 78,3 (Glc-3) ; 78,4 (C-3) ; 104,4 (Glc-1) ; 113,1 (C-5'') ; 114,8 (C-3', C-5') ; 116,6 (C-2'') ; 120,6 (C-6'') ; 130,5 (C-2', C-6') ; 136,0 (C-1') ; 136,9 (C-1'') ; 147,2 (C-4'') ; 147,5 (C-3'') ; 159,3 (C-4').

Le composé 6 (59)-AB2-101-3

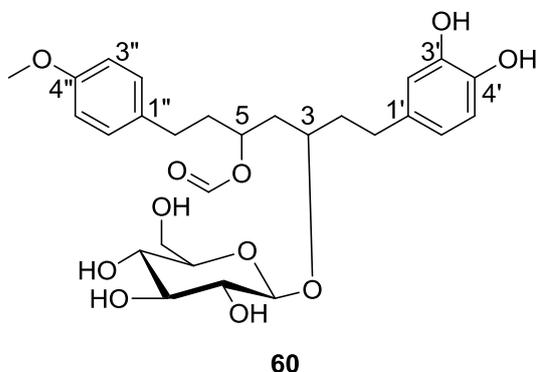
**C₂₆H₃₆O₁₁****M** = 524,56 g.mol⁻¹**Obtention :**Isolé des feuilles de *Pyrostria major* $\rho = 3,4 \times 10^{-7}\%$ p/p**Activités biologiques****FcB1** : non actif à 10 µg/mL**KB** : non actif à 10 µg/mL**HL-60** : non actif à 10 µg/mL**MRC-5** : non actif à 10 µg/mL**L. donovani** : non actif à 10 µg/mL**T. brucei** : 12,5 µM**Aspect** : solide amorphe marron**SM-ESIHR** [M + Na]⁺ $m/z = 547,2166$ (calculée pour C₂₆H₃₆O₁₁Na, 547,2155)**UV**, λ_{\max} (MeOH) (log ϵ) : 221 nm (4,1), 282 nm (3,7)**IR**, ν_{\max} en cm⁻¹: 3291, 1432, 1515, 1364, 1271, 1232, 1078, 1033, 725. $[\alpha]_{\text{D}}$: -16 (c 0,016, MeOH).**RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :**

δ (ppm) : 1,60-1,72 (4H, *m*, H₂-4, H₂-6) ; 1,74 (1H, *m*, H-2a) ; 1,93 (1H, *m*, H-2b) ; 2,48-2,66 (4H, *m*, H₂-1, H₂-7) ; 3,19 (1H, *t*, $J = 8,5$ Hz, Glc-2) ; 3,28 (1H, *m*, Glc-5) ; 3,33 (1H, *m*, Glc-4) ; 3,37 (1H, *m*, Glc-3) ; 3,71 (1H, *dd*, $J = 11,8, 5,5$ Hz, Glc-6a) ; 3,81 (3H, *s*, OMe-4'') ; 3,89 (1H, *dd*, $J = 11,8, 2,7$ Hz, Glc-6b) ; 3,90 (1H, *m*, H-5) ; 3,95 (1H, *m*, H-3) ; 4,39 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, Glc-1) ; 6,53 (1H, *dd*, $J = 8,5, 2,0$ Hz, H-6') ; 6,61 (1H, *dd*, $J = 8,5, 2,0$ Hz, H-6'') ; 6,65 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5') ; 6,66 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'') ; 6,69 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2') ; 6,80 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'').

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) :

δ (ppm) : 31,9 (C-1) ; 32,6 (C-7) ; 39,2 (C-2) ; 41,2 (C-6) ; 43,1 (C-4) ; 56,7 (OMe-4'') ; 63,0 (Glc-6) ; 68,5 (C-5) ; 71,8 (Glc-4) ; 75,7 (Glc-2) ; 78,1 (Glc-5) ; 78,3 (Glc-3) ; 78,4 (C-3) ; 104,3 (Glc-1) ; 113,1 (C-5'') ; 116,4 (C-5') ; 116,7 (C-2'') ; 116,9 (C-2') ; 120,7 (C-6'') ; 120,9 (C-6') ; 135,6 (C-1') ; 136,9 (C-1'') ; 144,2 (C-4'') ; 146,1 (C-3'') ; 147,2 (C-4') ; 147,5 (C-3').

Le composé 7 (60)-AB2-83-5

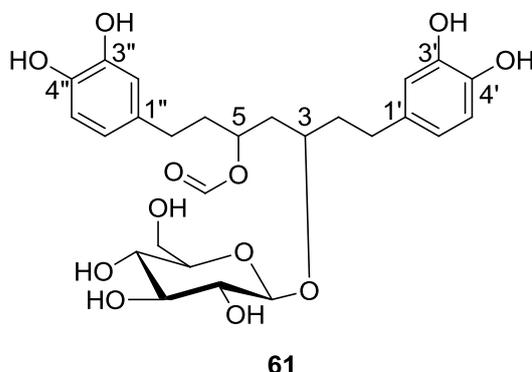
**C₂₇H₃₆O₁₁****M** = 536,57 g.mol⁻¹**Obtention :**Isolé des feuilles de *Pyrostria major* $\rho = 3,4 \times 10^{-7}\%$ p/p**Activités biologiques****FcB1** : non actif**KB** : non actif à 10 µg/mL**HL-60** : non actif à 10 µg/mL**MRC-5** : non actif à 10 µg/mL*L. donovani**T. brucei***Aspect** : solide amorphe marron.**SM-ESIHR** [M + Na]⁺ *m/z* = 559,2241 (calculée pour C₂₇H₃₆O₁₁Na, 559,2155).**UV**, λ_{\max} (MeOH) (log ϵ) : 223 nm (4,1), 279 nm (3,6).**IR**, ν_{\max} en cm⁻¹: 3291, 1710, 1512, 1432, 1364, 1271, 1232, 1078, 1033, 815.**[α]_D** : +10 (*c* 0,032, MeOH).**RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :**

δ (ppm) : 1,75 (1H, *m*, H-2a) ; 1,80-1,95 (5H, *m*, H₂-4, H₂-6, H-2b) ; 2,49-2,60 (4H, *m*, H₂-1, H₂-7) ; 3,20 (1H, *t*, *J* = 8,5 Hz, Glc-2) ; 3,23 (1H, *m*, Glc-5) ; 3,32 (1H, *m*, Glc-4) ; 3,34 (1H, *m*, Glc-3) ; 3,71 (1H, *dd*, *J* = 11,8, 5,5 Hz, Glc-6a) ; 3,74 (1H, *m*, H-3) ; 3,75 (3H, *s*, OMe-4'') ; 3,87 (1H, *dd*, *J* = 11,8, 2,7 Hz, Glc-6b) ; 4,39 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, Glc-1) ; 5,19 (1H, *m*, H-5) ; 6,52 (1H, *dd*, *J* = 8,0, 2,0 Hz, H-6') ; 6,66 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-5') ; 6,70 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2') ; 6,82 (2H, *d*, *J* = 8,5, 2,0 Hz, H-3'', H-5'') ; 7,06 (2H, *d*, *J* = 8,5, 2,0 Hz, H-2'', H-6'') ; 8,12 (1H, *s*, CHO-5).

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) :

δ (ppm) : 31,6 (C-1) ; 31,7 (C-7) ; 38,0 (C-6) ; 38,8 (C-2) ; 40,6 (C-4) ; 55,8 (4''-OMe) ; 63,0 (Glc-6) ; 71,8 (Glc-4) ; 73,1 (C-5) ; 75,5 (Glc-2) ; 77,1 (C-3) ; 78,0 (Glc-5) ; 78,3 (Glc-3) ; 104,0 (Glc-1) ; 115,0 (C-3'', C-5'') ; 116,4 (C-5') ; 117,0 (C-2') ; 121,0 (C-6') ; 130,4 (C-2'', C-6'') ; 134,9 (C-1'') ; 135,4 (C-1') ; 144,3 (C-4') ; 146,2 (C-3') ; 159,6 (C-4'') ; 163,5 (5-CO)

Le composé 8 (61)-AB2-83-2



$$M = 538,54 \text{ g.mol}^{-1}$$

Obtention :

Isolé des feuilles de *Pyrostria major*

$$\rho = 3,4 \times 10^{-7} \% \text{ p/p}$$

Activités biologiques

FcB1 : non actif

KB : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$

HL-60 : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$

MRC-5 : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$

L. donovani

T. brucei

Aspect : solide amorphe marron.

SM-ESIHR $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z = 561,2037$ (calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{12}\text{Na}$, 561,1948)

UV, λ_{max} (MeOH) (log ϵ) : 222 nm (3,9), 281 nm (3,6).

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 3409, 1660, 1069

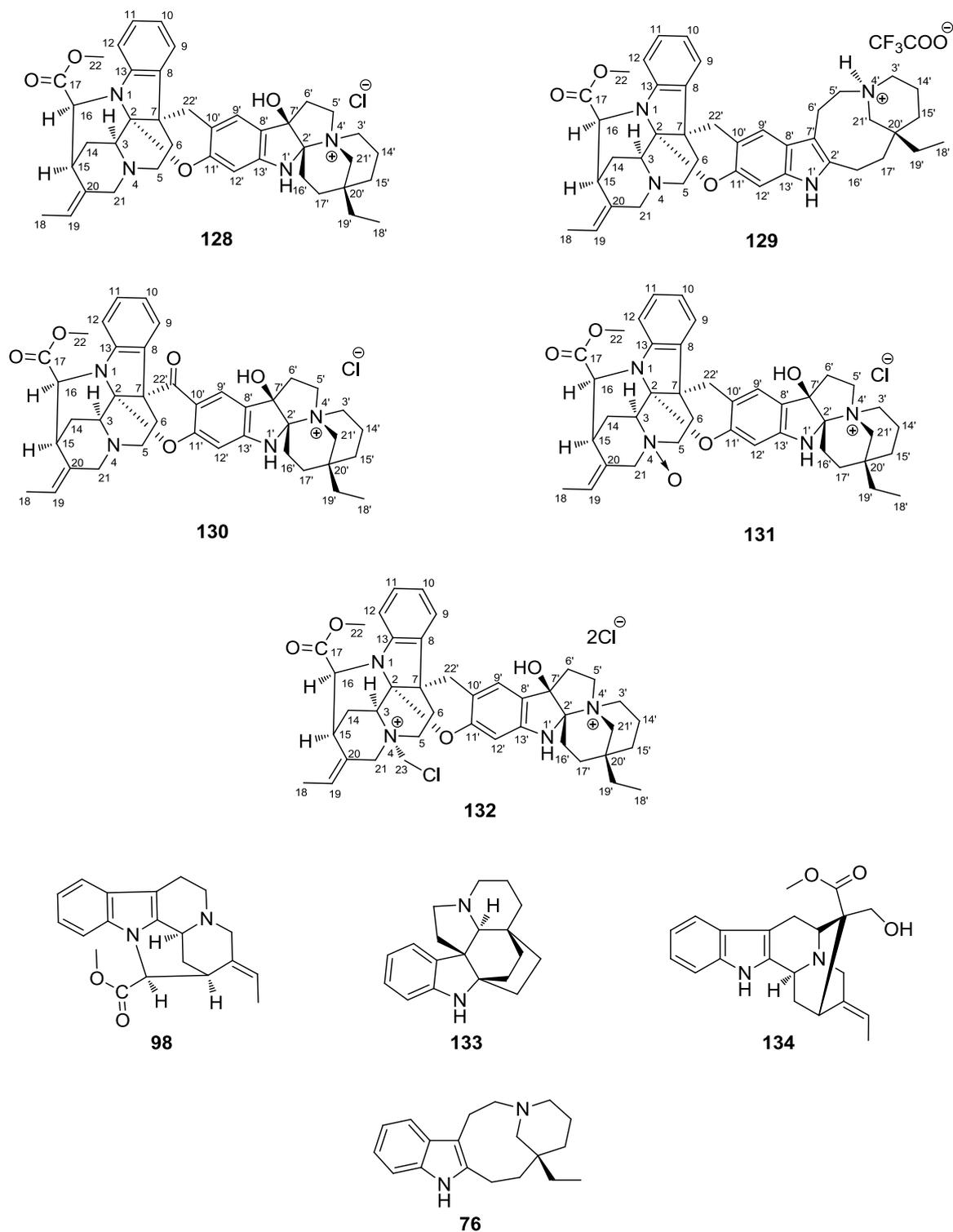
$[\alpha]_{\text{D}}$: -61 (c 0,024, MeOH).

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) :

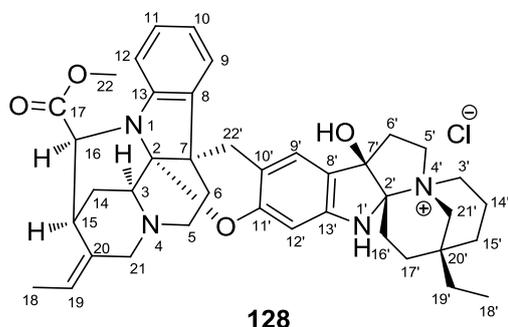
δ (ppm) : 1,75 (1H, *m*, H-2a) ; 1,80-1,95 (5H, *m*, H₂-4, H₂-6, H-2b) ; 2,49-2,60 (4H, *m*, H₂-1, H₂-7) ; 3,18 (1H, *t*, $J = 8,5$ Hz, Glc-2) ; 3,23 (1H, *m*, Glc-5) ; 3,32 (1H, *m*, Glc-4) ; 3,34 (1H, *m*, Glc-3) ; 3,71 (1H, *dd*, $J = 11,8, 5,5$ Hz, Glc-6a) ; 3,72 (1H, *m*, H-3) ; 3,87 (1H, *dd*, $J = 11,8, 2,7$ Hz, Glc-6b) ; 4,39 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, Glc-1) ; 5,19 (1H, *m*, H-5) ; 6,47 (1H, *dd*, $J = 8,0, 2,0$ Hz, H-6'') ; 6,52 (1H, *dd*, $J = 8,0, 2,0$ Hz, H-6') ; 6,60 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'') ; 6,65 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5') ; 6,66 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-5'') ; 6,70 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-2') ; 8,12 (1H, *s*, CHO-5).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) :

δ (ppm) : 31,7 (C-1) ; 32,0 (C-7) ; 38,1 (C-6) ; 38,9 (C-2) ; 40,7 (C-4) ; 62,9 (Glc-6) ; 71,8 (Glc-4) ; 73,3 (C-5) ; 75,6 (Glc-2) ; 77,2 (C-3) ; 78,0 (Glc-5) ; 78,3 (Glc-3) ; 104,1 (Glc-1) ; 116,4 (C-5'') ; 116,5 (C-5') ; 116,7 (C-2'') ; 116,9 (2') ; 120,8 (C-6') ; 121,0 (C-6'') ; 134,5 (C-1'') ; 135,4 (C-1') ; 144,3 (C-4') ; 144,5 (C-4'') ; 146,1 (C-3'') ; 146,3 (C-3') ; 163,5 (5-CO)

3.2 *Gonioma malagasy* BoiteauFigure 140. Structures des composés isolés de *G. malagasy*

Goniomedine A (128)-AB3-42-4



$$M = 685,29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Obtention :

Isolé de l'extrait AT de *G. malagasy*

$$\rho = 0,04 \% \text{ p/p}$$

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

KB : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

MRC-5 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Aspect : solide amorphe rouge.

SM-ESIHR $[M]^+ m/z = 649,3756$ (calculée pour $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_4$, 649,3754).

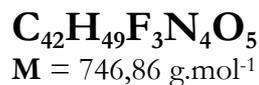
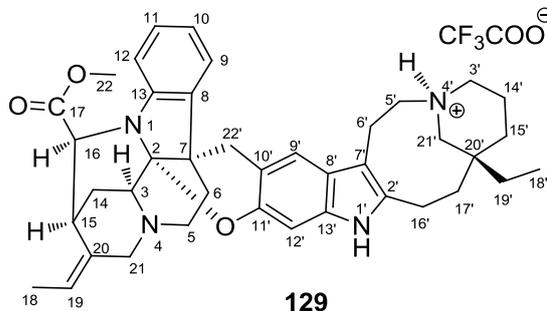
UV, λ_{max} (MeOH) (log ϵ) : 209 nm (4,56), 296 nm (3,80).

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 3400, 1750, 1665, 1130, 828.

$[\alpha]_{\text{D}}$: +114 (c 0,1, MeOH).

RMN ^1H et ^{13}C (600 et 150 MHz, DMF) : Voir Annexe 8

Goniomedine B (129)-AB3-123-4

**Obtention :**

Isolé de l'extrait EtOH des écorces de

G. malagasy

$\rho = 0,1\%$ p/p

Activités biologiques

FcB1 : $2,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$

KB : $9,19 \pm 1,08 \mu\text{M}$

MRC-5 : $8,78 \pm 1,41 \mu\text{M}$

Aspect : solide amorphe rouge.

SM-ESIHR $[M]^+$ $m/z = 633,3813$ (calculée pour $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_3$, 663,3805).

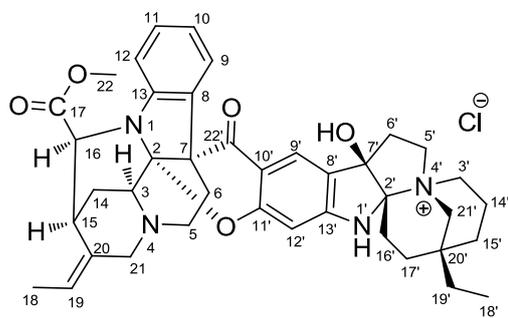
UV, λ_{max} (MeOH) ($\log \epsilon$) : 206 nm (4,66), 237 nm (4,4), 293 nm (4,04).

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 3400, 1750, 1665, 1130, 828.

$[\alpha]_{\text{D}}$: + 62 (c 0,05, MeOH).

RMN ¹H et ¹³C (600 et 150 MHz, DMF) : Voir Annexe 8

Goniomedine C (130)-AB3-89-2



130



M = 699,28 g.mol⁻¹

Obtention :

Isolé de l'extrait AT des écorces de

G. malagasy

$\rho = 0,001 \text{ \% p/p}$

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 µg/mL

KB : non actif à 10 µg/mL

MRC-5 : non actif à 10 µg/mL

Aspect : solide amorphe marron.

SM-ESIHR [M]⁺ $m/z = 663,3566$ (calculée pour C₄₀H₄₇N₄O₅, 663,3546).

UV, λ_{\max} (MeOH) (log ϵ) : 230 nm (3), 300 nm (3,68).

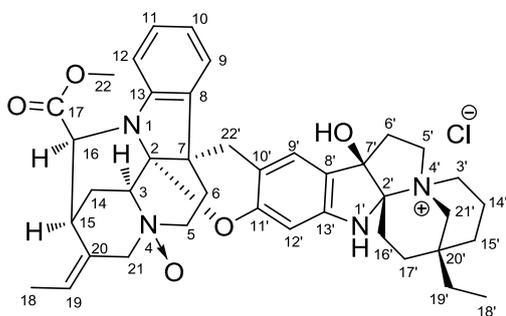
IR, ν_{\max} en cm⁻¹: 3400, 1750, 1665, 1130, 828.

[α]_D : +66 (*c* 0,1, MeOH).

RMN ¹H et ¹³C (600 et 150 MHz, DMF) : Voir Annexe 8

:

Goniomedine D (131)-AB3-47-3



131



M = 701,29 g.mol⁻¹

Obtention :

Isolé de l'extrait AT des écorces de

G. malagasy

$\rho = 0,003 \text{ \% p/p}$

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 µg/mL

KB : non actif à 10 µg/mL

MRC-5 : non actif à 10 µg/mL

Aspect : solide amorphe rouge.

SM-ESIHR [M]⁺ $m/z = 665,3701$ (calculée pour C₄₀H₄₉N₄O₅, 665,3703).

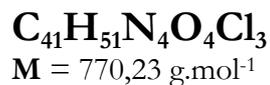
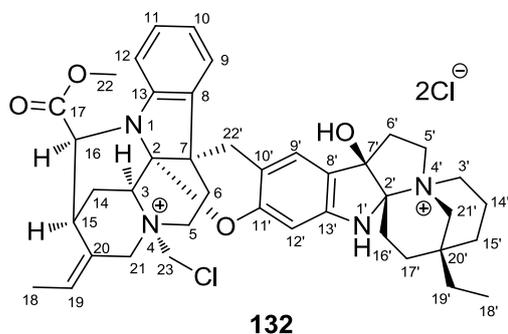
UV, λ_{\max} (MeOH) (log ϵ) : 210 nm (4,4), 249 nm (3,7), 300 nm (3,2).

IR, ν_{\max} en cm⁻¹: 3400, 1750, 1130, 828.

[α]_D : + 128 (*c* 0,1, MeOH).

RMN ¹H et ¹³C (600 et 150 MHz, DMF) : Voir Annexe 8

Goniomedine E (132)-AB3-26-5



Obtention :

Isolé de l'extrait AT des écorces de
G. malagasy
 $\rho = 0,03 \%$ p/p

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$

KB : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$

MRC-5 : non actif à 10 $\mu\text{g/mL}$

Aspect : solide amorphe rouge.

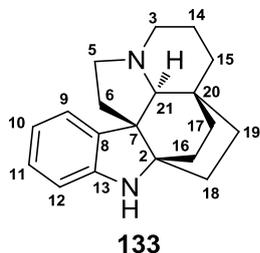
SM-ESIHR $[M]^{2+} m/z = 349,1731$ (calculée pour C₄₁H₅₁N₄O₄Cl, 698,3588).

UV, λ_{max} (MeOH) (log ϵ) : 206 nm (4,4), 300 nm (3,5).

IR, ν_{max} en cm⁻¹: 3400, 1750, 1130, 828.

$[\alpha]_{\text{D}}$: +129 (c 0,1, MeOH).

RMN ¹H et ¹³C (600 et 150 MHz, DMF) : Voir Annexe 8

(+)-Aspidofractinine (133)-AB3-104-1

$$M = 280,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Obtention :

Isolé de l'extrait AT des écorces de

G. malagasy

$$\rho = 0,004 \% \text{ p/p}$$

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

KB : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

MRC-5 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Aspect : solide amorphe marron.

SM-ESIHR $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z = 281,2014$ (calculée pour $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_2$, 281,2018).

UV, λ_{max} (MeOH) ($\log \epsilon$) : 241 nm (3,8), 291 nm (3,4).

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 3360, 2920, 2850, 1609.

$[\alpha]_{\text{D}}$: +14 (c 0,1, MeOH). ($[\alpha]_{\text{D}}$ litt : + 12 (c 0,1, MeOH)).²⁰⁷

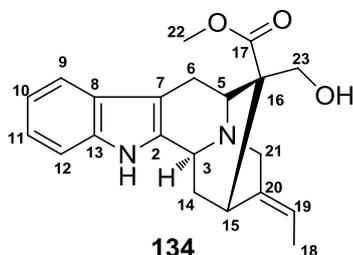
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : voir référence.²⁰⁷

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm) : 15,3 (C-14) ; 25,5 (C-17) ; 29,5 (C-16) ; 30,0 (C-18) ; 30,5 (C-20) ; 32,9 (C-6) ; 33,1 (C-15) ; 35,0 (C-10) ; 47,1 (C-3) ; 50,7 (C-5) ; 57,5 (C-7) ; 64,3 (C-2) ; 67,7 (C-21) ; 112,3 (C-12) ; 122,5 (C-10) ; 123,5 (C-9) ; 128,4 (C-11) ; 136,2 (C-8) ; 147,5 (C-13).

²⁰⁷ Gagnon, D. et al. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 6035-6041.

Akuammidine (134)-AB3-44-3



$$M = 352,43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Obtention :

Isolé de l'extrait AT des écorces de

G. malagasy

$$\rho = 0,004 \% \text{ p/p}$$

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

KB : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

MRC-5 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Aspect : solide amorphe rouge.

SM-ESIHR $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z = 353,1865$ (calculée pour $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3$, 353,1865).

UV, λ_{max} (MeOH) (log ϵ) : 222 nm (4,2), 284 nm (3,6).

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 3450, 2950, 1730, 1670, 1120, 740.

$[\alpha]_{\text{D}}$: +20 (c 0,1, MeOH). ($[\alpha]_{\text{D}}$ litt : + 21 (c 1, EtOH)).²⁰⁸

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) :

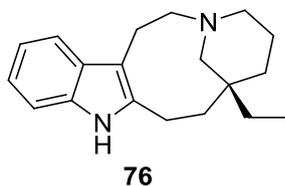
δ (ppm) : 1,78 (3H, *d*, $J = 7,0$ Hz, H₃-18) ; 2,29 (1H, *t*, $J = 11,8$ Hz, H-14a) ; 2,96-3,00 (4H, *m*, H₃-22, H-14b) ; 3,13 (1H, *dd*, $J = 16,5, 4,4$ Hz, H-6a) ; 3,53 (1H, *m*, H-15) ; 3,66 (1H, *m*, H-5) ; 3,71 (1H, *d*, $J = 9,8$ Hz, H-23a) ; 3,72 (1H, *m*, H-6b) ; 3,85 (1H, *d*, $J = 9,8$ Hz, H-23b) ; 4,15 (1H, *d*, $J = 15,8$ Hz, H-21a) ; 4,23 (1H, *d*, $J = 15,3$ Hz, H-21b) ; 4,98 (1H, *d*, $J = 10,7$ Hz, H-3) ; 5,72 (1H, *qd*, $J = 7, 1,4$ Hz, H-19) ; 7,07 (1H, *t*, $J = 7,5$ Hz, H-10) ; 7,17 (1H, *t*, $J = 7,5$ Hz, H-11) ; 7,36 (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz, H-12) ; 7,47 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-9).

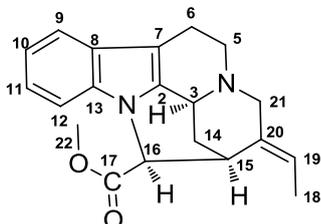
RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) :

δ (ppm) : 13,5 (C-18) ; 23,6 (C-6) ; 28,6 (C-14) ; 29,5 (C-15) ; 51,8 (C-16) ; 52,4 (C-22) ; 53,8 (C-3) ; 55,0 (C-21) ; 60,1 (C-5) ; 67,9 (C-23) ; 105,3 (C-7) ; 112,7 (C-12) ; 119,2 (C-9) ; 120,9 (C-10) ; 123,9 (C-19) ; 123,9 (C-11) ; 127,0 (C-8) ; 128,6 (C-20) ; 132,6 (C-2) ; 139,0 (C-13) ; 172,1 (C-17).

²⁰⁸ Henry, T. A. *J. Chem. Soc.* **1932**, 2759-2768.

(-)-Quebrachamine (76)-AB3-128-1

**C₁₉H₂₆N₂****M = 282,42 g.mol⁻¹****Obtention :**Isolé de l'extrait AT des feuilles de
G. malagasy $\rho = 5 \times 10^{-4} \% \text{ p/p}$ **Activités biologiques****FcB1** : non testé**KB** : non testé**MRC-5** : non testé**Aspect** : solide amorphe marron.**SM-ESIHR** [M + H]⁺ $m/z = 283,2185$ (calculée pour C₁₉H₂₇N₂, 283,2174).**UV, λ_{max} (MeOH) (log ϵ)** : 222 nm (4,4), 284 nm (3,8), 291 nm (3,8).**IR, ν_{max} en cm⁻¹**: 3291, 2957, 1462, 1131, 740.**[α]_D** : -90 (*c* 0,27, CHCl₃). (**[α]_D litt** : - 100 (*c* 0,27, CHCl₃)).²⁰⁹**RMN ¹H et ¹³C (500 et 125 MHz, CDCl₃)** : voir référence²⁰⁹²⁰⁹ Amat, M. et al. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4431-4439.

(+)-Pleiocarpamine (98)-AB3-71-2**98**

M = 322,40 g.mol⁻¹

Obtention :

Isolé de l'extrait AT des écorces de

G. malagasy

$\rho = 0,001 \text{ \% p/p}$

Activités biologiques**FcB1** : non actif à 10 µg/mL**KB** : 4,86 ± 1,16 µM**MRC-5** : 4,08 ± 0,23 µM**Aspect** : solide amorphe jaune.**SM-ESIHR** [M + H]⁺ m/z = 323,1760 (calculée pour C₂₀H₂₃N₂O₂, 323,1760).**UV, λ_{max} (MeOH) (log ε)** : 227 nm (4,4), 283 nm (3,9).**IR, ν_{max} en cm⁻¹**: 3450, 2950, 1730, 1670, 1120, 740.**[α]_D** : + 130 (c 0,1, MeOH). (**[α]_D** litt : + 135 (c 0,1, CHCl₃).²¹⁰**RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) :**

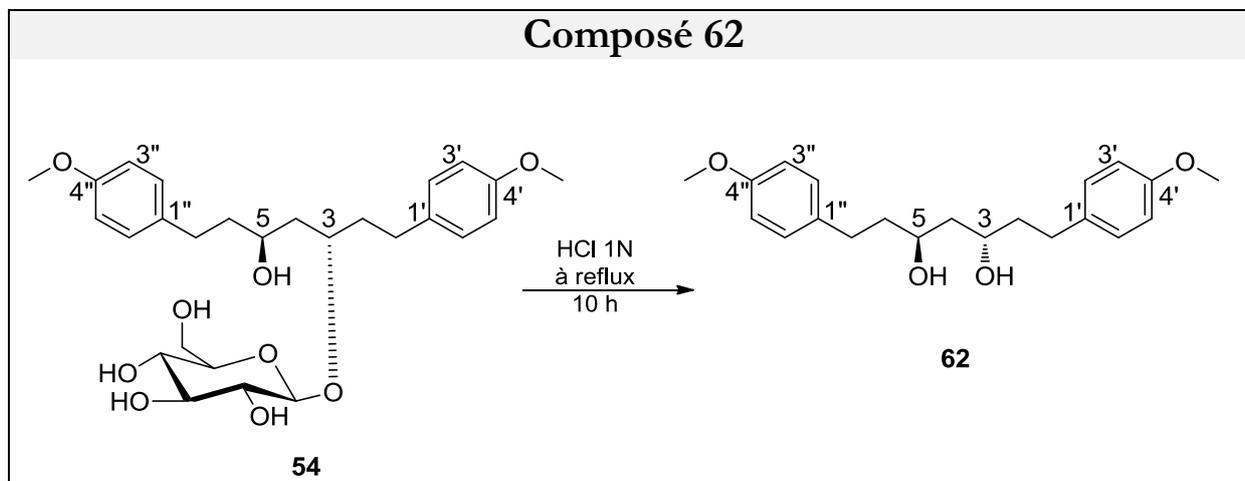
δ (ppm) : 1,62 (3H, *dd*, $J = 7,0, 1,9$ Hz, H₃₋₁₈) ; 2,27 (1H, *m*, H-21a) ; 2,40 (1H, *ddd*, $J = 15, 3,8, 2,4$ Hz, H-14a) ; 2,83 (1H, *dt*, $J = 12,5, 8,2$ Hz, H_{5a}) ; 2,89 (1H, *dt*, $J = 15, 2,4$ Hz, H-14b) ; 3,20 (1H, *dt*, $J = 15,9, 8,7$ Hz, H-6a) ; 3,40 (1H, *d*, $J = 13,4$ Hz, H-21b) ; 3,46 (1H, *ddd*, $J = 15,8, 8, 1,3$ Hz, H-6b) ; 3,66 (3H, *s*, H₃₋₂₂) ; 3,81 (1H, *m*, H-15) ; 3,85 (1H, *ddd*, $J = 13, 10, 1$ Hz, H-5b) ; 4,81 (1H, *m*, H-3) ; 5,47 (1H, *d*, $J = 4,4$ Hz, H-16) ; 5,72 (1H, *qd*, $J = 7, 1,9$ Hz, H-19) ; 7,09 (1H, *d*, $J = 7,9$ Hz, H-12) ; 7,17 (1H, *td*, $J = 7,5, 1,3$ Hz, H-10) ; 7,21 (1H, *td*, $J = 7,5, 1,3$ Hz, H-11) ; 7,65 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-9)..

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) :

δ (ppm) : 13,1 (C-18), 19,9 (C-6), 26,5 (C-14), 33,3 (C-15), 52,4 (C-5), 52,8 (C-3), 53,1 (C-22), 57,5 (C-21), 61,4 (C-16), 111,7 (C-7), 114,2 (C-12), 120,4 (C-9), 122,2 (C-10), 123,9 (C-11), 128,6 (C-8), 129,2 (C-20), 130,8 (C-19), 132,3 (C-2), 140,3 (C-13), 171,0 (C-17).

210 Akinloye, B. A. et al. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 307-311.

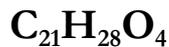
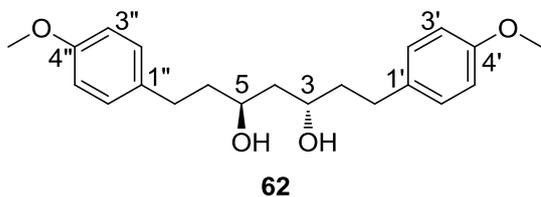
4-Modes opératoires et caractéristiques physiques et spectrales des composés hémisynthétiques



Mode opératoire :

Dans un ballon de 20 mL, 23 mg du composé 1 (**54**) ont été solubilisés dans 10 mL de HCl (1N). La solution a été portée au reflux pendant 10 h. L'hydrolysate a été extrait avec 3 x 10 mL d'AcOEt. Les phases organiques ont été rassemblées, séchées sur du Na₂SO₄ et concentrées sous vide pour donner le composé **62** (14 mg, 0,04 mmol) avec un rendement de 90%. La phase aqueuse a été lyophilisée. Le résidu sec contenant le sucre a été analysé par SFC dans les conditions citées au paragraphe (1.2.3.3 SFC).

Composé 62-AB2-96-1



$$M = 344,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 µg/mL

KB : non actif à 10 µg/mL

HL-60 : non actif à 10 µg/mL

MRC-5 : non actif à 10 µg/mL

L. donovani : non actif à 10 µg/mL

T. brucei : non actif à 10 µg/mL

Aspect : solide amorphe incolore

SM-ESIHR: $[M + \text{Na}]^+ m/z = 367,1884$ (calculée pour $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Na}$, 367,1885).

UV, λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) : 241 nm (3,2) ; 278 nm (3,5)

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 1513, 1246, 3373, 761, 768.

$[\alpha]_{\text{D}}$: - 3,76 (c 0,05, CHCl_3).

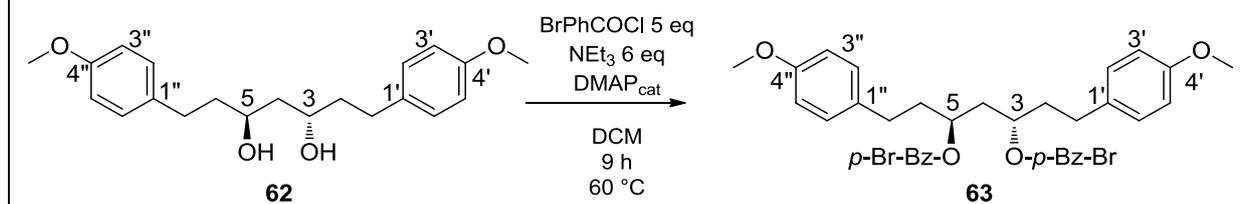
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm) : 1,64 (2H, *t*, $J = 5,7$ Hz, $\text{H}_2\text{-4}$) ; 1,67-1,84 (4H, *m*, $\text{H}_2\text{-2}$, $\text{H}_2\text{-6}$) ; 2,10 (2H, *s*, OH-3 , OH-5) ; 2,56-2,72 (4H, *m*, $\text{H}_2\text{-1}$, $\text{H}_2\text{-7}$) ; 3,76 (3H x 2, *s*, OMe x 2) ; 3,95 (2H, *m*, H-3 , H-5) ; 6,81 (4H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-3' , H-5' , H-3'' , H-5'') ; 7,09 (4H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-2' , H-6' , H-2'' , H-6'')

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm) : 31,4 (C-1, C-7) ; 39,5 (C-2, C-6) ; 42,7 (C-4) ; 55,4 ($4'\text{-OMe}$, $4''\text{-OMe}$) ; 69,1 (C-3, C-5) ; 114,1 (C-3', C-5', C-3'', C-5'') ; 129,4 (C-2', C-6', C-2'', C-6'') ; 134,0 (C-1', C-1'') ; 158,0 (C-4', C-4'').

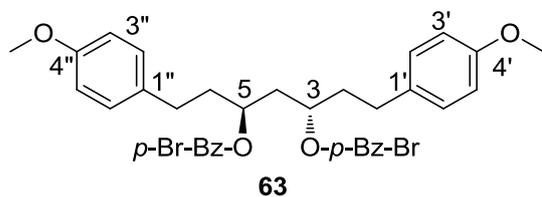
Composé 63



Mode opératoire :

Dans un tube scellé, 13 mg du composé **62** (0,037 mmol, 1,00 éq.) et 40 mg de chlorure d'acide parabromobenzoïque (0,18 mmol, 5,00 éq.) ont été solubilisés dans 0,6 mL de DCM anhydre. Le diméthylaminopyridine a ensuite été ajoutée en quantité catalytique (15 mg, 0,12 mmol). 32 μ L de triéthylamine (0,22 mmol, 6,00 éq.) ont été additionnées. La solution a été portée à 60 °C. Après 9 h de réaction, le chauffage a été arrêté et 20 mL d'eau ont été ajoutés. La mixture a été extraite par 3 x 10 mL d'AcOEt. Les phases organiques ont été rassemblées, séchées sur du Na₂SO₄ et concentrées sous vide puis le résidu a été purifié par colonne chromatographique (Si, DCM/MeOH 95/5) pour obtenir le composé **63** (12 mg, 0,016 mmol) avec un rendement de 45%.

Composé 63-AB2-137-2



$$M = 710,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 µg/mL

KB : non actif à 10 µg/mL

HL-60 : non actif à 10 µg/mL

MRC-5 : non actif à 10 µg/mL

L. donovani : non actif à 10 µg/mL

T. brucei : non actif à 10 µg/mL

Aspect : solide amorphe marron.

SM-ESIHR: $[M + \text{Na}]^+ m/z = 731,0616$ (calculée pour $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{Br}_2\text{O}_6\text{Na}$, 731,0620).

UV, λ_{max} (CHCl_3) (**log ε**) : 318 nm (3,6) ; 247 nm (4,3), 228 nm (4,1).

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 2930, 2864, 1716, 1589, 1513, 1032, 1011, 848, 809, 682.

$[\alpha]_{\text{D}}$: + 10 (c 0,1, CHCl_3).

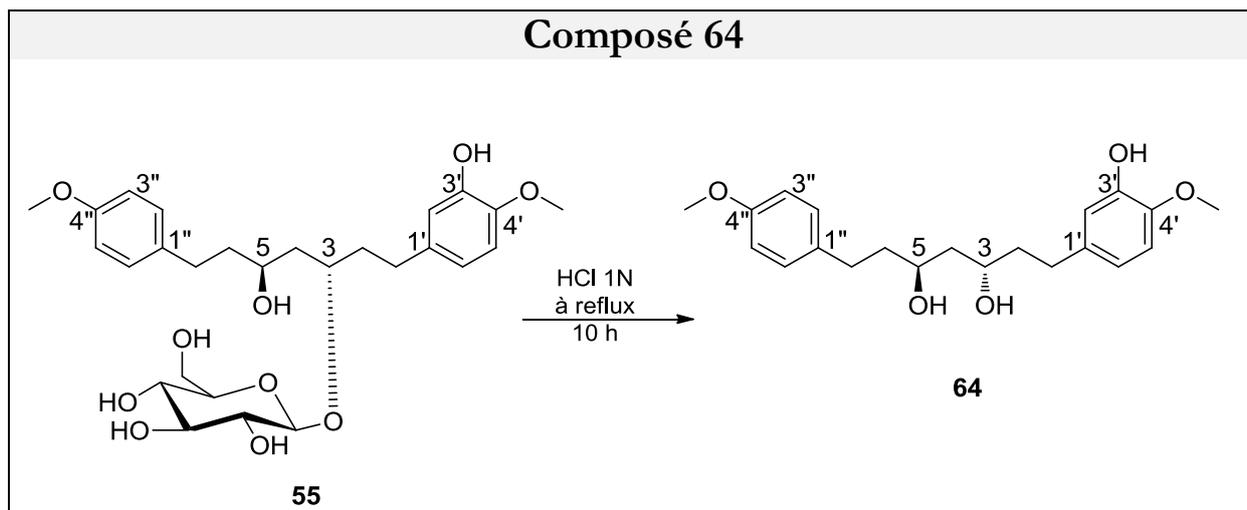
CD, λ_{max} (**EtOH**) ($\Delta\epsilon$) : 252,7 (+9,31), 235,6 (-9,22).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm) : 1,86-2,08 (4H, *m*, H₂-2, H₂-6) ; 2,10 (2H, *m*, H-4) ; 2,59 (4H, *m*, H₂-1, H₂-7) ; 3,73 (3H x 2, *s*, OMe x 2) ; 5,23 (2H, *m*, H-3, H-6) ; 6,75 (4H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-3', H-5', H-3'', H-5'') ; 7,02 (4H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-2', H-6', H-2'', H-6''). *P*-bromobenzoate : 7,43 (4H, *d*, $J = 8,5$ Hz) ; 7,68 (4H, *d*, $J = 8,5$ Hz)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) :

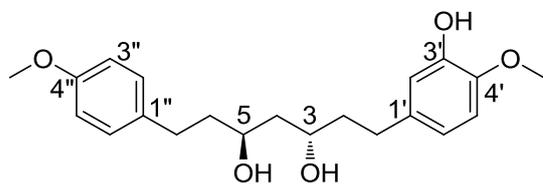
δ (ppm) : 30,9 (C-1, C-7) ; 36,4 (C-2, C-6) ; 38,2 (C-4) ; 55,4 (4'-OMe, 4''-OMe) ; 71,5 (C-3, C-5) ; 114,1 (C-3', C-5', C-3'', C-5'') ; 129,4 (C-2', C-6', C-2'', C-6'') ; 133,2 (C-1', C-1'') ; 158,0 (C-4', C-4''). *P*-bromobenzoate : 128,1 (x 2) ; 129,3 (x 2) ; 131,2 (x 4) ; 131,7 (x 4) ; 165,4 (x 2).



Mode opératoire :

Le composé 2 (**55**) (30 mg, 0,052 mmol) a été hydrolysé dans les mêmes conditions que le composé 1 (**54**) pour donner le composé **64** (16 mg, 0,04 mmol) avec un rendement de 77%. La phase aqueuse a été lyophilisée. Le résidu sec contenant le sucre a été analysé par SFC dans les conditions citées au paragraphe (1.2.3.3 SFC).

Composé 64-AB2-130-1



64

 $C_{21}H_{28}O_5$ $M = 360,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KB : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-60 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MRC-5 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *L. donovani* : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *T. brucei* : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Aspect : solide amorphe marron

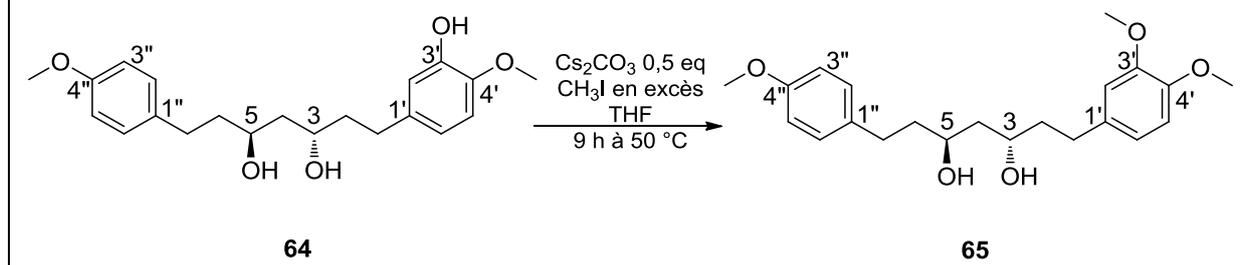
SM-ESIHR: $[M + Na]^+ m/z = 383,1816$ (calculée pour $C_{21}H_{28}O_5Na$, 383,1834).UV, λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) : 279 nm (3,6)IR, ν_{max} en cm^{-1} : 3407, 1590, 1514, 812, 764. $[\alpha]_D : -10$ (c 0,1, CHCl_3).RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm) : 1,62 (2H, *t*, $J = 5,7$ Hz, H₂-4) ; 1,66-1,83 (4H, *m*, H₂-2, H₂-6) ; 2,51-2,71 (4H, *m*, H₂-1, H₂-7) ; 3,76 (3H, *s*, OMe-4'') ; 3,83 (3H, *s*, OMe-4') ; 3,94 (2H, *m*, H-3, H-5) ; 6,64 (1H, *dd*, $J = 8,5, 2$ Hz, H-6') ; 6,74 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5') ; 6,75 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-2') ; 6,79 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-3'', H-5'') ; 7,08 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-2'', H-6'') .

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm) : 31,4 (C-7) ; 31,7 (C-1) ; 39,2 (C-2) ; 39,4 (C-6) ; 42,7 (C-4) ; 55,4 (4''-OMe) ; 56,2 (4'-OMe) ; 69,1 (C-3, C-5) ; 110,9 (C-5') ; 114,1 (C-3'', C-5'') ; 114,8 (C-2') ; 119,9 (C-6') ; 129,4 (C-2'', C-6'') ; 134,1 (C-1'') ; 135,3 (C-1') ; 145,0 (C-4') ; 145,7 (C-3') ; 158,0 (C-4'') .

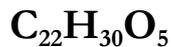
Composé 65



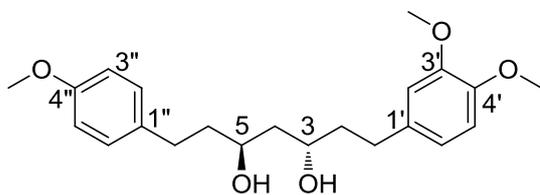
Mode opératoire :

Dans un tube scellé, 20 mg du composé **64** (0,05 mmol, 1,00 éq.) et 8 mg de carbonate de Césium (0,025 mmol, 0,5 éq.) ont été solubilisés dans 0,5 mL de THF anhydre. Un large excès d'iodure de méthyle a été ajouté. La solution a été portée à 50 °C. Après 9 h de réaction, le chauffage a été arrêté. La solution a été concentrée et le résidu purifié par colonne chromatographique (Si, DCM/MeOH 95/5) pour obtenir le composé **65** (12 mg, 0,03 mmol) avec un rendement de 65%.

Composé 65-AB2-144-2



$$M = 374,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$



65

Activités biologiques

Fcb1 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KB : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HL-60 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MRC-5 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *L. donovani* : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *T. brucei* : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

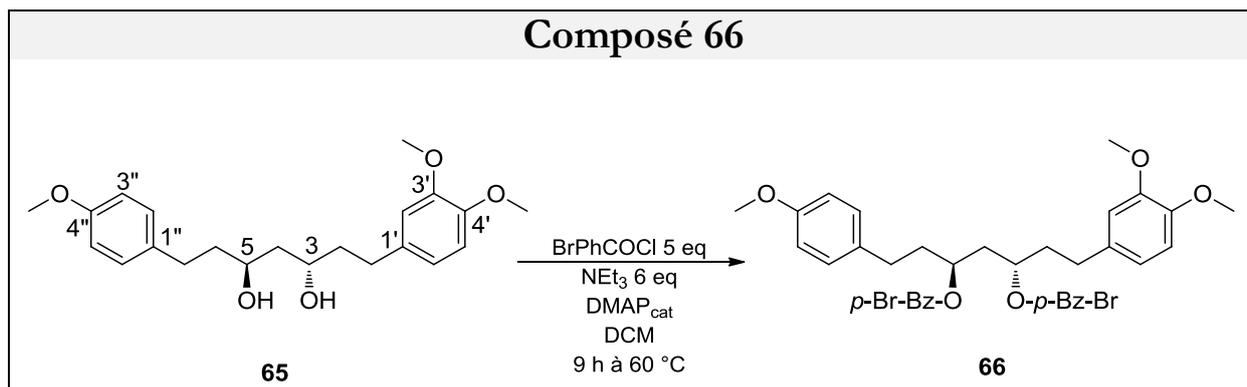
Aspect : solide amorphe marron

SM-ESIHR: $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z = 397,1996$ (calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Na}$, 397,1991).UV, λ_{max} (MeOH) ($\log \epsilon$) : 225 nm (4,8), 279 nm (4,3).IR, ν_{max} en cm^{-1} : 3407, 1611, 1590, 1155, 1030, 812, 764. $[\alpha]_{\text{D}}$: -2,5 (c 0,07, MeOH).RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) :

δ (ppm) : 1,65 (2H, *t*, $J = 5,7$ Hz, H₂-4) ; 1,68-1,84 (4H, *m*, H₂-2, H₂-6) ; 2,56-2,73 (4H, *m*, H₂-1, H₂-7) ; 3,76 (3H, *s*, OMe-4'') ; 3,83 (3H, *s*, OMe-4') ; 3,84 (3H, *s*, OMe-3'') ; 3,96 (2H, *m*, H-3, H-5) ; 6,70 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-2') ; 6,71 (1H, *dd*, $J = 8,5, 2,0$ Hz, H-6') ; 6,77 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5') ; 6,81 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-3'', H-5'') ; 7,09 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-2'', H-6'').

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) :

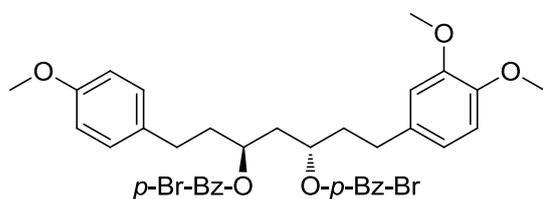
δ (ppm) : 31,4 (C-7) ; 32,0 (C-1) ; 39,5 (C-2, C-6) ; 42,8 (C-4) ; 55,5 (4''-OMe) ; 56,0 (3'-OMe) ; 56,1 (4'-OMe) ; 69,2 (C-3, C-5) ; 111,5 (C-5') ; 111,9 (C-2') ; 114,1 (C-3'', C-5'') ; 120,3 (C-6') ; 129,4 (C-2'', C-6'') ; 134,0 (C-1'') ; 134,7 (C-1') ; 147,5 (C-4') ; 149,1 (C-3') ; 158,1 (C-4'').



Mode opératoire :

Le composé **65** (6 mg, 0,016 mmol) a été estérifié dans les mêmes conditions que le composé **62**, pour donner le composé **66** (6 mg, 0,008 mmol) avec un rendement de 50%.

Composé 66-AB2-152-1



66

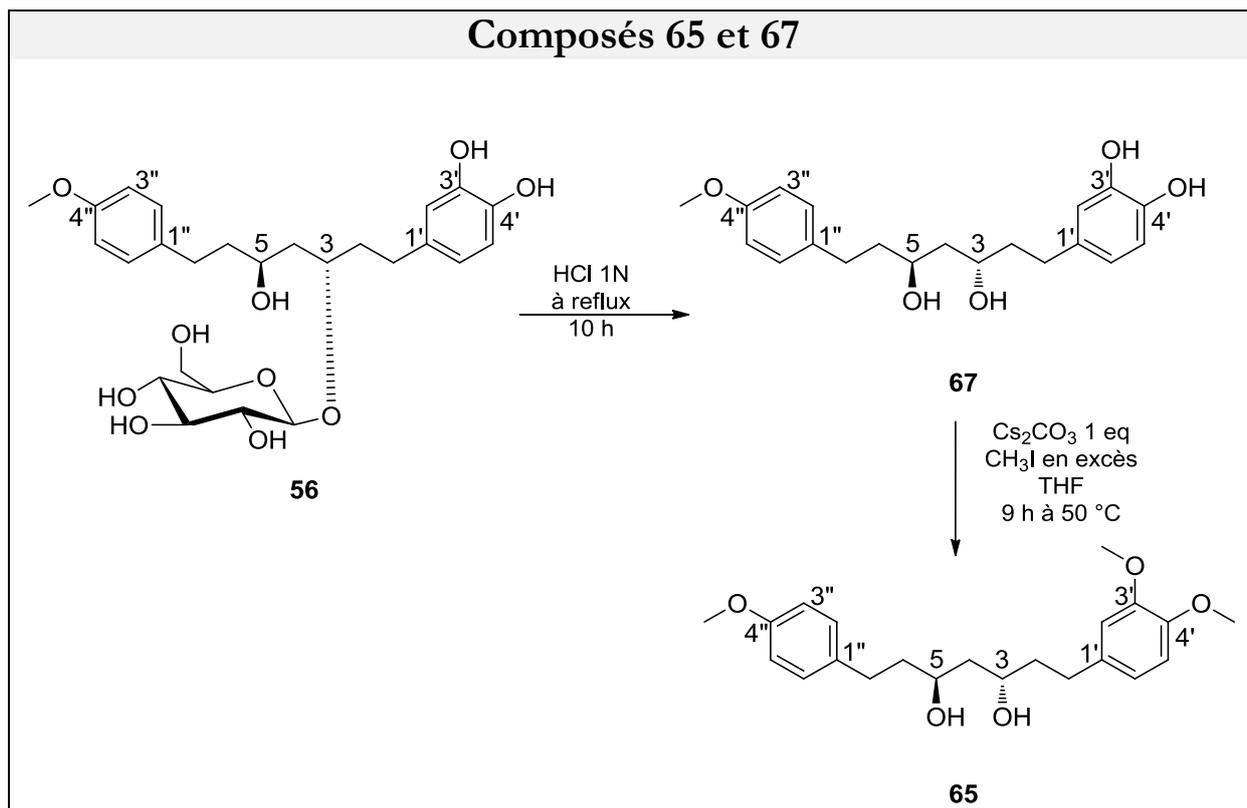
C₃₆H₃₆Br₂O₇**M = 740,47 g.mol⁻¹****Activités biologiques****FcB1** : 16,45 ± 0,79 μM**KB** : non actif à 10 μg/mL**HL-60** : non actif à 10 μg/mL**MRC-5** : non actif à 10 μg/mL**L. donovani** : 10,5 ± 0,8 μM**T. brucei** : non actif à 10 μg/mL**Aspect** : solide amorphe incolore.**SM-ESIHR**: [M + Na]⁺ m/z = 761,0761 (calculée pour C₃₆H₃₆Br₂O₇Na, 761,0725).**UV**, λ_{max} (CHCl₃) (log ε) : 225 nm (4,3), 246 nm (4,6).**IR**, ν_{max} en cm⁻¹: 2930, 1720, 1513, 1480, 1270, 1140, 1016, 809, 755, 682.**[α]_D** : +30 (c 0,1, CHCl₃).**CD**, λ_{max} (EtOH) (Δε) : 253 nm (+15,52), 237 nm (-11,77).**RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) :**

δ (ppm) : 1,86-2,08 (4H, m, H₂-2, H₂-6) ; 2,10 (2H, m, H₂-4) ; 2,59 (4H, m, H₂-1, H₂-7) ; 3,73 (3H, s, OMe-4'') ; 3,79 (3H, s, OMe-4') ; 3,80 (3H, s, OMe-3') ; 5,26 (2H, m, H-3, H-6) ; 6,63 (1H, dd, J = 8,5, 2,0 Hz, H-6'') ; 6,64 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-2') ; 6,70 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-5') ; 6,75 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-3'', H-5'') ; 7,02 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-2'', H-6'') ; 7,43 (4H, d, J = 8,5 Hz) ; 7,68 (4H, d, J = 8,5 Hz) .

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) :

δ (ppm) : 30,9 (C-7) ; 31,4 (C-1) ; 36,4 (C-2, C-6) ; 38,3 (C-4) ; 55,4 (4''-OMe) ; 56,0 (4'-OMe) ; 56,1 (3'-OMe) ; 71,4-71,5 (C-3, C-5) ; 111,4 (C-5') ; 111,9 (C-2'') ; 114,0 (C-3'', C-5'') ; 120,3 (C-6') ; 129,4 (C-2'', C-6'') ; 133,2 (C-1'') ; 133,7 (C-1') ; 147,5 (C-3') ; 149,1 (C-4') ; 158,1 (C-4'') .

P-bromobenzoate : 128,2 (x 2) ; 129,3 (x 2) ; 131,2 (x 4) ; 131,7 (x 4) ; 165,4 (x 2) .

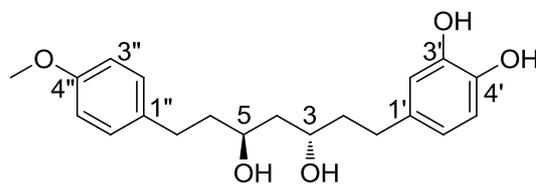


Mode opératoire :

Le composé 3 (**56**) (30 mg, 0,06 mmol) a été hydrolysé dans les mêmes conditions que le composé 1 (**54**) pour donner le composé **67** (22 mg, 0,058 mmol) avec un rendement de 96%. La phase aqueuse a été lyophilisée. Le résidu sec contenant le sucre a été analysé par SFC dans les conditions citées au paragraphe (1.2.3.3 SFC).

Le composé **67** (7 mg, 0,02 mmol) a été méthylié dans les mêmes conditions que le composé **64** pour donner le composé **65** (4 mg, 0,01 mmol) avec un rendement de 53 %.

Composé 67-AB2-154-1



67

 $C_{20}H_{26}O_5$ $M = 346,42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

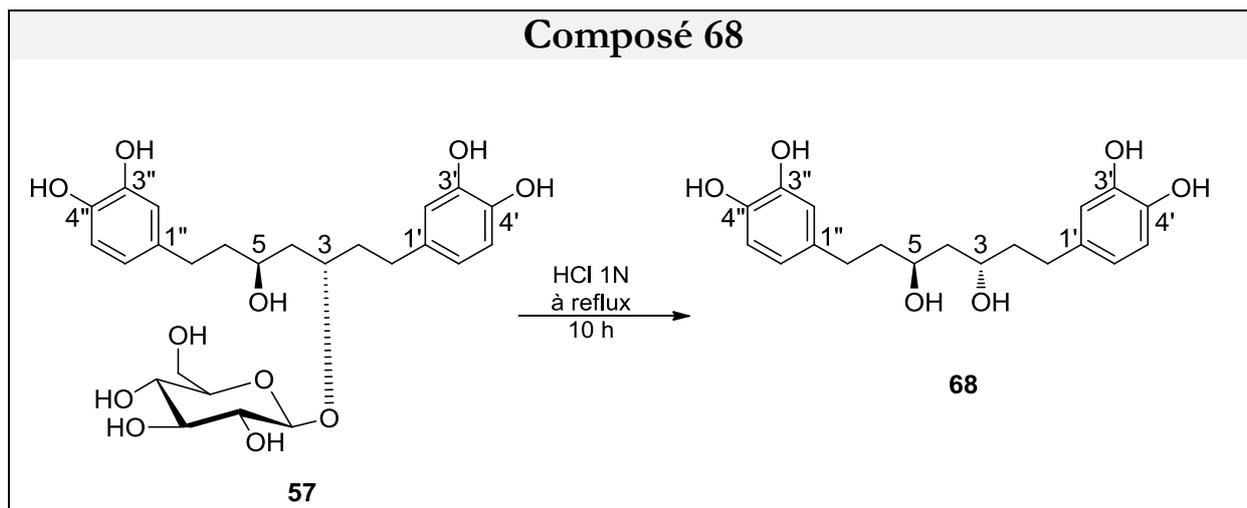
Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **KB** : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **HL-60** : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **MRC-5** : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *L. donovani* : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *T. brucei* : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **Aspect** : solide amorphe noir**SM-ESIHR**: $[M + Na]^+ m/z = 369,1678$ (calculée pour $C_{20}H_{26}O_5Na$, 369,1678).**UV**, λ_{max} (MeOH) ($\log \epsilon$) : 222 nm (4,2), 284 nm (3,6).**IR**, ν_{max} en cm^{-1} : 3340, 1513, 1246, 824, 797. $[\alpha]_D$: - 10 (c 0,1, MeOH).**RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) :**

δ (ppm) : 1,54 (2H, *t*, $J = 6,2$ Hz, H₂-4) ; 1,68 (4H, *m*, H₂-2, H₂-6) ; 2,46-2,71 (4H, *m*, H₂-1, H₂-7) ; 3,74 (3H, *s*, OMe-4'') ; 3,80 (2H, *m*, H-3, H-5) ; 6,50 (1H, *dd*, $J = 8,5, 2$ Hz, H-6'') ; 6,63 (1H, *d*, $J = 2$ Hz, H-2'') ; 6,66 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5'') ; 6,80 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-3'', H-5'') ; 7,09 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-2'', H-6'').

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) :

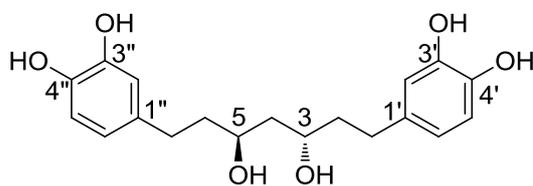
δ (ppm) : 32,2 (C-7) ; 32,5 (C-1) ; 41,4 (C-2, C-6) ; 45,7 (C-4) ; 55,7 (4''-OMe) ; 69,8-68,9 (C-3, C-5) ; 114,9 (C-3'', C-5'') ; 116,4 (C-5') ; 116,7 (C-2') ; 120,8 (C-6') ; 130,4 (C-2'', C-6'') ; 135,4 (C-1') ; 135,8 (C-1'') ; 144,3 (C-4') ; 146,2 (C-3') ; 159,7 (C-4'').



Mode opératoire :

Le composé 4 (**57**) (27 mg, 0,052 mmol) a été hydrolysé dans les mêmes conditions que le composé 1 (**54**) pour donner le composé **68** (15 mg, 0,043 mmol) avec un rendement de 86%. La phase aqueuse a été lyophilisée. Le résidu sec contenant le sucre a été analysé par SFC dans les conditions citées au paragraphe (1.2.3.3 SFC).

Composé 68-AB2-181-1



68



$$M = 348,39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Activités biologiques

FcB1 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

KB : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

HL-60 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

MRC-5 : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

L. donovani : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

T. brucei : non actif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Aspect : solide amorphe marron.

SM-ESIHR: $[M + H]^+ m/z = 349,1653$ (calculée pour $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_6$, 349,1651).

UV, λ_{max} (MeOH) ($\log \epsilon$) : 221 nm (4,0), 283 nm (3,7).

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 3440, 1519, 1370, 1058, 815, 782.

$[\alpha]_{\text{D}}$: - 10 (c 0,1, MeOH).

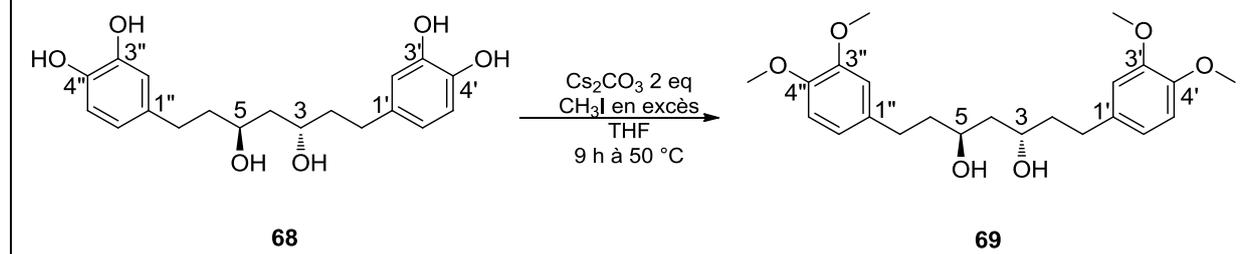
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) :

δ (ppm) : 1,53 (2H, *t*, $J = 6,2$ Hz, H₂-4) ; 1,67 (4H, *m*, H₂-2, H₂-6) ; 2,46-2,64 (4H, *m*, H₂-1, H₂-7) ; 3,80 (2H, *m*, H-3, H-5) ; 6,51 (2H, *dd*, $J = 8,5, 2$ Hz, H-6', H-6'') ; 6,63 (2H, *d*, $J = 2$ Hz, H-2', H-2'') ; 6,66 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz, H-5', H-5'').

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) :

δ (ppm) : 32,5 (C-1, C-7) ; 41,4 (C-2, C-6) ; 45,7 (C-4) ; 68,9 (C-3, C-5) ; 116,4 (C-5', C-5'') ; 116,7 (C-2', C-2'') ; 120,8 (C-6', C-6'') ; 135,4 (C-1', C-1'') ; 144,2 (C-4', C-4'') ; 146,2 (C-3', C-3'').

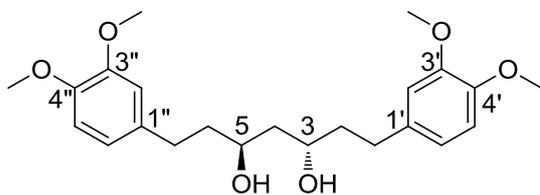
Composé 69



Mode opératoire :

Le composé **68** (11 mg, 0,031 mmol) a été méthylié dans les mêmes conditions que le composé **64** pour donner le composé **69** (5 mg, 0,012 mmol) avec un rendement de 40 %.

Composé 69- AB2-184-2



69

 $C_{23}H_{32}O_6$ M = 404,49 g.mol⁻¹

Activités biologiques

FcB1 : 4,1 ± 0,8 μM

KB : 175,5 ± 6,3 μM

HL-60 : 140 ± 7 μM

MRC-5 : > 250 μM

L. donovani : non actif à 10 μg/mL*T. brucei* : non actif à 10 μg/mL

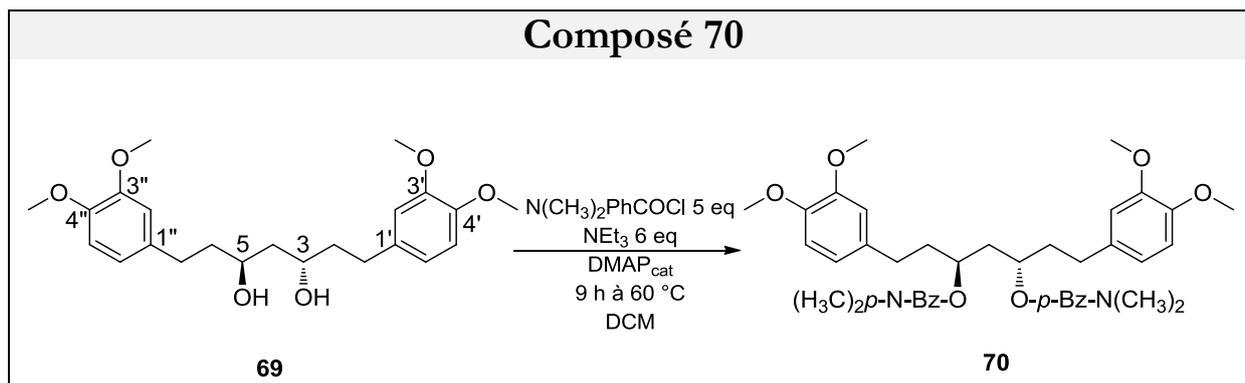
Aspect : solide amorphe marron.

SM-ESIHR: [M + Na]⁺ m/z = 427,2084 (calculée pour C₂₃H₃₂O₆Na, 427,2097).UV, λ_{max} (MeOH) (log ε) : 228 nm (5,0), 279 nm (4,6).IR, ν_{max} en cm⁻¹: 3280, 1600, 1580, 1420, 1145, 1020, 803, 787, 765.[α]_D : -20 (c 0,1, MeOH).RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) :

δ (ppm) : 1,65 (2H, t, J = 5,7 Hz, H₂-4) ; 1,70-1,86 (4H, m, H₂-2, H₂-6) ; 2,54-2,74 (4H, m, H₂-1, H₂-7) ; 3,83 (3H x 2, s, OMe-4', OMe-4'') ; 3,85 (3H x 2, s, OMe-3', OMe-3'') ; 3,98 (2H, m, H-3, H-5) ; 6,70 (2H, d, J = 2 Hz, H-2', H-2'') ; 6,71 (2H, dd, J = 8,5, 2 Hz, H-6', H-6'') ; 6,77 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-5', H-5'').

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) :

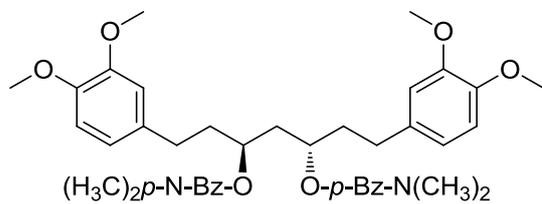
δ (ppm) : 32,0 (C-1, C-7) ; 39,5 (C-2, C-6) ; 42,8 (C-4) ; 56,0 (3'-OMe, 3''-OMe) ; 56,1 (4'-OMe, 4''-OMe) ; 69,2 (C-3, C-5) ; 111,6 (C-5', C-5'') ; 112,0 (C-2', C-2'') ; 120,4 (C-6', C-6'') ; 134,6 (C-1', C-1'') ; 147,5 (C-4', C-4'') ; 149,1 (C-3', C-3'').



Mode opératoire :

Dans un tube scellé, 4 mg du composé **69** (0,0098 mmol, 1,00 éq.) et 10 mg de chlorure d'acide diméthylaminobenzoïque (0,05 mmol, 5,00 éq.) ont été solubilisés dans 0,6 mL de DCM anhydre. Le diméthylaminopyridine a ensuite été ajoutée en quantité catalytique (10 mg, 0,08 mmol). 10 μL de triéthylamine (0,06 mmol, 6,00 éq.) ont été additionnées. La solution a été portée à 60 °C. Après 9 h de réaction, le chauffage a été arrêté et 20 mL d'eau ont été ajoutés. La mixture a été extraite par 3 x 10 mL d'AcOEt. Les phases organiques ont été rassemblées, séchées sur du Na_2SO_4 et concentrées sous vide puis le résidu a été purifié par colonne chromatographique (Si, DCM/MeOH 95/5) pour obtenir le composé **70** (2 mg, 0,002 mmol) avec un rendement de 30 %.

Composé 70-AB3-9-2



70



$$M = 698,84 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Activités biologiques

FcB1 : $4,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$

KB : non actif à $10 \mu\text{g}/\text{mL}$

HL-60 : non actif à $10 \mu\text{g}/\text{mL}$

MRC-5 : non actif à $10 \mu\text{g}/\text{mL}$

L. donovani : non actif à $10 \mu\text{g}/\text{mL}$

T. brucei : non actif à $10 \mu\text{g}/\text{mL}$

Aspect : solide amorphe marron.

SM-ESIHR: $[\text{M} + \text{NH}_4]^+ m/z = 716,3916$ (calculée pour $\text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{O}_8$, 716,3911).

UV, λ_{max} (CHCl_3) ($\log \epsilon$) : 229 nm (4,4), 311 nm (4,7).

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 2989, 1702, 1435, 1020, 803, 787, 765

$[\alpha]_{\text{D}}$: +30 (c 0,07, EtOH).

CD, λ_{max} (EtOH) ($\Delta\epsilon$) : 319,8 nm (+24,5), 296,6 nm (-22,1).

Données RMN ^1H et ^{13}C : Voir référence ²¹¹

²¹¹ S.-I.Uehara et al. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 3298.

5-Essais biologiques

5.1 Évaluation de l'activité antiplasmodiale

5.1.1 Culture *in vitro* de la phase intraérythrocytaire de *P. falciparum*

La souche FcB1 du *P. falciparum* provenant de Colombie et résistante à la chloroquine, est maintenue en culture sur hématies humaines O+ à un hématoците de 4 % sous une atmosphère de 91 % de N₂, 3 % de CO₂, 6 % d'O₂, à 37 °C, selon la méthode mise au point par Trager et Jensen.²¹²

Les globules rouges, de préférence du groupe O, doivent être utilisés dans les trois semaines consécutives au prélèvement. Les hématies sont lavées deux fois (centrifugation à 800 g, 5 min. à T° ambiante) dans du milieu de culture sans sérum juste avant leur utilisation.

Il n'est pas conseillé de laver les hématies et de les stocker à 4 °C car celles-ci deviennent très rapidement inefficaces à supporter la croissance du parasite (perte d'ATP notamment).

Le milieu de culture utilisé est du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) contenant 25 mM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) ajusté à pH 7,5, 27,5 mM d' NaHCO₃, 11 mM de glucose. Si nécessaire, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine sont ajoutés au milieu. Enfin, 5 à 8 % (v/v) de sérum humain décomplémenté (30 min. à 56 °C) sont additionnés ; le tout est filtré en condition stérile et peut être conservé une à deux semaines à 4 °C. Pour les faibles parasitémies, le milieu est changé quotidiennement par aspiration et plusieurs fois par jour pour des parasitémies supérieures à 5 %. Les cultures à parasitémie élevée sont diluées avec de nouvelles hématies préalablement lavées par centrifugation (600 g, 5 min) avec le milieu de culture. La parasitémie est estimée sur frottis sanguin colorés au Diff Quick® (Baxter, France) par comptage d'au moins 1000 hématies.

Cette coloration repose sur l'action complémentaire de deux colorants neutres sur l'affinité des éléments cellulaires pour les colorants acides ou basiques. L'éosine, un colorant acide, va se fixer sur les éléments cellulaires basiques, ou éosinophiles, dans ce cas, le cytoplasme des hématies et du parasite (coloré en rose). Le bleu de méthylène, un colorant basique, va se fixer sur les éléments cellulaires acides, ou basophiles, tel que l'ADN. Les hématies des mammifères étant anucléées, la coloration au bleu de méthylène va se concentrer sur les éléments cellulaires du parasite au sein des hématies infectées.

²¹² Trager, W. et al. *Science* **1976**, *193*, 673-675.

5.1.2 Évaluation *in vitro* de l'activité antipaludique de molécules ou d'extraits en plaque multipuits

L'activité antipaludique est évaluée selon la méthode de Desjardin⁷⁵ par incorporation d'hypoxanthine tritiée dans l'ADN parasite. Les hématies humaines étant anucléées, cette incorporation est le reflet de l'activité antiparasitaire des molécules testées.

Une culture asynchrone du *P. falciparum* est mise en présence de concentrations successives décroissantes de la drogue testée, en plaque 96 puits (dans le cas d'extraits bruts, l'activité est généralement évaluée pour une concentration fixe de 10 µg/mL). Le volume total de chaque puit est de 200 µL :

- 100 µL de drogue diluée dans du milieu de culture à une concentration deux fois supérieures à la concentration finale désirée (gamme de concentration 200 µM à 0,1 µM)
- 100 µL de suspension d'hématies parasitées dans du milieu de culture (1 % de parasitémie, 2 % d'hématocrite).

Les plaques sont incubées à 37 °C sous jarre dont l'atmosphère a été appauvrie en O₂, pendant 24 heures. 25 µL d'hypoxanthine tritiée (20 µCi/mL) sont ensuite distribués dans chaque puits et les plaques incubées dans les mêmes conditions pour une période supplémentaire de 24 heures. Les plaques sont ensuite congelées et décongelées pour lyser les cellules. L'ADN des différents puits est alors récupéré et déposé sur filtres en fibres de verre au moyen d'un collecteur automatique. La radioactivité est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les essais sont réalisés en triplicata.

On détermine alors la CI₅₀ (concentration inhibant 50 % de la croissance parasite) pour chaque drogue testée à partir d'une courbe dont la fonction est :

$$f(\text{taux de radioactivité}) = -\log(\text{concentration de la drogue}).$$

5.2 Évaluation de la cytotoxicité sur cellules KB, HL-60 et MRC-5

L'évaluation de la cytotoxicité des fractions et produits purs a été effectuée à l'ICSN (Equipe 21, Geneviève Aubert et Thierry Cresteil.)

Les essais de cytotoxicité sur lignées cellulaires KB (cancer du nasopharynx) et MRC-5 (cellules saines, fibroblastes pulmonaires d'embryons humains) et HL-60 (cellules myéloïdes progénitrices humaines) ont été réalisés à l'ICSN par Geneviève Aubert, d'après la procédure publiée par Tempête.²¹³

Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM à 37 °C, puis placées à 37 °C sous atmosphère 95 % d'air et 5 % de CO₂ 4 jours avant le test, et enfin comptées afin de déterminer leur densité. Elles sont ensuite diluées pour obtenir un nombre constant de cellules par puits, puis distribuées en plaques de 96 puits. Après 24 h, les produits à tester sont déposés en duplicate ainsi que le témoin positif (Taxotere® (docétaxel)). Après 3 jours d'incubation, l'inhibition potentielle de la prolifération cellulaire est évaluée par ajout de MTS (réactif Proméga). Ce révélateur, en se fixant sur les mitochondries des cellules vivantes, est réduit en formazan coloré qui absorbe à 490 nm (plus la coloration est faible, plus le produit est actif). Après de 2 heures d'incubation, la densité optique (DO) de chaque puits est mesurée par spectrophotométrie. On peut alors déterminer le pourcentage de cellules vivantes par rapport au témoin (puits avec du DMSO) et par conséquent le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire, à une concentration donnée, d'après la formule :

$$\% \text{ d'inhibition} = (1 - (\text{DO essai} / \text{DO témoin})) \times 100.$$

Les tests sont généralement réalisés à 10 puis 1 µg/mL lors des premiers essais. En cas de résultats positifs, des mesures de CI₅₀ (concentration minimum pour avoir 50 % d'inhibition de la croissance cellulaire) sont alors réalisées en évaluant la cytotoxicité d'un produit sur une échelle de concentrations et ainsi déterminer la concentration pour avoir 50 % d'inhibition à partir des courbes dose-réponse.

²¹³ Tempête, C. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 647-650.

5.3 Évaluation de l'activité antileishmanienne

L'évaluation de l'activité antileishmanienne des produits purs a été effectuée à la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Paris-Sud, par les professeurs Philippe Loiseau et Christian Bories.

Les formes promastigotes de *Leishmania donovani* (MHOM/ET/67/HU3), appelées LV9, ont été cultivées dans le milieu M-199 (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) supplémentées avec 10 % de sérum bovin fœtal inactivé (Invitrogen, Eragny, France), 40 mM HEPES (VWR, Paisley, Ecosse), 100 µM d'adénosine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) et 0,5 mg/mL d'hémine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) en présence de 50 µg/mL de gentamicine à 26 °C sous atmosphère 5 % CO₂.

Les macrophages péritonéaux ont été récoltés à partir de souris femelles CD1 (Charles River, Cléon, France) trois jours après une injection péritonéale de 1,5 mL d'une solution de thioglycolate de Sodium (Biomérieux). Ils sont ensuite, distribués dans des chamber slide à 8 puits (LabTek Ltd.) à une densité de 5 x 10⁴ par puit (400 µL par puit) dans du RPMI 1640 contenant 10 % hi-FCS, 25 mM d'HEPES et 2 mM de L-glutamine (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France).

Quatre heures plus tard, les macrophages sont étalés puis lavés pour éliminer les fibroblastes. Après une période d'incubation de 24 heures, les macrophages ont été infectés par les formes promastigotes de *L. donovani* LV9 sur une phase stationnaire à raison de 10 parasites par macrophages pour obtenir 87 % de macrophages infectés et 103 formes amastigotes par macrophages. Après 18 heures, les formes promastigotes libres sont éliminées et les formes amastigotes intramacrophagiques sont traitées avec différentes concentrations de produits purs.

La pentamidine et l'amphotéricine B ont été utilisés comme témoins positifs. Le milieu de culture est renouvelé au bout de 48 heures et un nouveau milieu de culture contenant les substances actives est ajouté. L'expérience est arrêtée après cinq jours et les pourcentages de macrophages infectés sont évalués au microscope après coloration de Giemsa. Les CI₅₀ sont déterminées par une analyse de régression linéaire et exprimées en µM. Chaque expérience a été réalisée en triplicata.

5.4 Évaluation de l'activité antitrypanosomale

L'évaluation de l'activité antitrypanosomale des produits purs a été effectuée à la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Paris-Sud, par les professeurs Philippe Loiseau et Christian Bories selon une procédure décrite par Loiseau.²¹⁴

En bref, les formes sanguines de *T. brucei brucei* ont été maintenues *in vitro* pendant 24 heures dans l'obscurité à 37 °C dans une atmosphère de 5 % de CO₂ dans un milieu minimum essentiel (Gibco BRL) qui comprend 25 mM d'HEPES et de sels d'Earle, 2 mM de L-glutamine, 1 g/L de glucose, 1 mL/L de milieu minimum contenant des acides aminés non essentiels (100, Gibco BRL), 0,2 mM de 2-mercapthoethanol, 2 mM de pyruvate de Sodium, 0,1 mM d'hypoxanthine, 0,016 mM de thymidine, 15 % de sérum de cheval inactivé par la chaleur (Gibco BRL) et 50 µg/mL de gentamycine.

L'évaluation de l'activité biologique des composés a été réalisée en plaques de 96 puits dans un volume final de 200 µL contenant 2×10^5 de trypomastigotes préalablement purifiés par centrifugation du sang d'une souris infectée, et prélevés de manière aseptique à partir du sinus rétro-orbitaire. La pentamidine a été employée comme témoin positif.

La Concentration Effectrice Minimale (CEM) correspond à la concentration minimale à laquelle aucun parasite viable n'est observé au microscope. Cette valeur a été confirmée par l'injection intrapéritonéale de la culture du puits, correspondant à la CEM, à une souris afin de confirmer que les parasites non-mobiles ont été réellement tués et ne sont plus aptes à se multiplier.

²¹⁴ Espuelas, S. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2190-2192.

Bibliographie

http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map&r=.125&la=-19.5&lo=45&kind=Gonioma, **11/06/2012**

<http://www.theplantlist.org/browse/A/Apocynaceae/>, **11/08/2012**

<http://www.nlm.nih.gov/hmd/index.html>, **16/07/2012**

Addae-Kyereme, Jonathan, Croft, Simon L., Kendrick, Howard and Wright, Colin W. Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; in vivo antimalarial activity of pleiocarpine, *J. Ethnopharmacol.*, **2001**, *76*, (1), 99-103.

Adrian, H. RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children, *N. Eng. J. Med.*, **2012**, *366*, (8), 764-766.

Aerts, Rob J., Waal, Anthony, Pennings, Ed J. M. and Verpoorte, Rob The distribution of strictosidine-synthase activity and alkaloids in *Cinchona* plants, *Planta*, **1991**, *183*, (4), 536-541.

Akinloye, Bamidele A. and Court, William E. Leaf alkaloids of *Rauwolfia volkensii*, *Phytochemistry*, **1980**, *19*, (2), 307-311.

Allinger, Norman L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, (25), 8127-8134.

Amat, Mercedes, Lozano, Oscar, Escolano, Carmen, Molins, Elies and Bosch, Joan Enantioselective Synthesis of 3,3-Disubstituted Piperidine Derivatives by Enolate Dialkylation of Phenylglycinol-Derived Oxazolopiperidone Lactams, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, (12), 4431-4439.

An, Ning, Zhang, Hong-wu, Xu, Li-zhen, Yang, Shi-lin and Zou, Zhong-mei New diarylheptanoids from the rhizome of *Alpinia officinarum* Hance, *Food. Chem.*, **2010**, *119*, (2), 513-517.

APG An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III, *Bot. J. Linn. Soc.*, **2009**, *161*, (2), 105-121.

Aragão Craveiro, A., da Costa Prado, A., Gottlieb, O. R. and Welerson de Albuquerque, P. C. Diarylheptanoids of *Centrolobium* species, *Phytochemistry*, **1970**, *9*, (8), 1869-1875.

Araujo, C. A. C., Alegrio, L. V. and Leon, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*, *Phytochemistry*, **1998**, *49*, (3), 751-754.

Becke, Axel D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, (7), 5648-5652.

Beer, R. J. S., Broadhurst, T. and Robertson, Alexander 964. Peroxides of tetrahydrocarbazole and related compounds. Part IV. Autoxidation of substituted tetrahydrocarbazoles, *J. Chem. Soc.*, **1952**, 4946-4951.

Benoit-Vical, Françoise, Lelievre, Joel, Berry, Antoine, Deymier, Caroline, Dechy-Cabaret, Odile, Cazelles, Jerome, Loup, Christophe, Robert, Anne, Magnaval, Jean-Francois and Meunier, Bernard Trioxaquinones Are New Antimalarial Agents Active on All Erythrocytic Forms, Including Gametocytes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, *51*, (4), 1463-1472.

Benyahia, Samira, Benayache, Samir, Benayache, Fadila, León, Francisco, Quintana, José, López, Matías, Hernández, Juan C., Estévez, Francisco and Bermejo, Jaime Cladocalol, a pentacyclic 28-nor-triterpene from *Eucalyptus cladocalyx* with cytotoxic activity, *Phytochemistry*, **2005**, *66*, (6), 627-632.

Berova, Nina, Bari, Lorenzo Di and Pescitelli, Gennaro Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, (6), 914-931.

Besselièvre, R., Langlois, N. and Potier, P. Chlorure de méthylène, solvant ou réactif?, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1972**, *4*, 1477.

- http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/O_BAI_Dict_Bot_2/BAI_Dict_Bot_2_729.pdf,
11/06/2012
- Boiadjiev, Stefan E. and Lightner, David A. Exciton Chirality. (A) Origins of and (B) Applications from Strongly Fluorescent Dipyrinone Chromophores, *Monatsh. Chem.*, **2005**, *136*, (3), 489-508.
- Borchardt, J. K. The beginnings of Drugs Therapy : Ancient Mesopotamian Medicine, *Drug News Perspect.*, **2002**, *15*, (3), 187-192.
- Bourjot, Mélanie, Apel, Cécile, Martin, Marie-Thérèse, Grellier, Philippe, Nguyen, Van Hung, Guéritte, Françoise and Litaudon, Marc Antiplasmodial, Antitrypanosomal, and Cytotoxic Activities of Prenylated Flavonoids Isolated from the Stem Bark of *Artocarpus styracifolius*, *Planta. Med.*, **2010**, *76*, (14), 1600,1604.
- Bremer, Birgitta and Eriksson, Torsten Time Tree of Rubiaceae: Phylogeny and Dating the Family, Subfamilies, and Tribes, *Int. J. Plant. Sci.*, **2009**, *170*, (6), 766-793.
- Bringmann, Gerhard, Bruhn, Torsten, Maksimenka, Katja and Hemberger, Yasmin The Assignment of Absolute Stereostructures through Quantum Chemical Circular Dichroism Calculations, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, *2009*, (17), 2717-2727.
- Bruhn, T., Hemberger, Y., Schaumlöffel, A. and Bringmann, G. University of Wuerzburg, Germany, *SpecDis Version 1.51*, **2010**,
- Bruneel, F. Les spiroindolones, un traitement d'avenir du paludisme ?, *Med. Maladies Infect.*, **2011**, *41*, (12), 675-676.
- Bussmann, Rainer, Gilbreath, Genevieve, Solio, John, Lutura, Manja, Lutuluo, Rumpac, Kunguru, Kimaren, Wood, Nick and Mathenge, Simon Plant use of the Maasai of Sekenani Valley, Maasai Mara, Kenya, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, **2006**, *2*, (1), 22.
- Cameron, Angus, Read, Jon, Tranter, Rebecca, Winter, Victoria J., Sessions, Richard B., Brady, R. Leo, Vivas, Livia, Easton, Anna, Kendrick, Howard, Croft, Simon L., Barros, David, Lavandera, Jose Luis, Martin, José Julio, Risco, Felix, García-Ochoa, Silvestre, Gamo, Francisco Javier, Sanz, Laura, Leon, Luisa, Ruiz, Jose R., Gabarró, Raquel, Mallo, Araceli and de las Heras, Federico Gómez Identification and Activity of a Series of Azole-based Compounds with Lactate Dehydrogenase-directed Anti-malarial Activity, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, (30), 31429-31439.
- Campaigne, E. and Lake, R. D. Synthesis of Tetrahydrocarbazoles and Carbazoles by the Bischler Reaction^{1,2}, *J. Org. Chem.*, **1959**, *24*, (4), 478-487.
- Carvalho, L. H., Rocha, E. M., Raslan, D. S., Oliveira, A. B., Krettli, A. U. and U., Antoniana In vitro activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **1988**, *21*, (3), 485-487.
- Cavaco, Alberto Judice Leote Notes sur quelques Vanguériées (Rubiaceae), *Adansonia*, **1967**, *7*, (3), 357-361.
- Chang, George, Guida, Wayne C. and Still, W. Clark An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, (12), 4379-4386.
- Charman, Susan A., Arbe-Barnes, Sarah, Bathurst, Ian C., Brun, Reto, Campbell, Michael, Charman, William N., Chiu, Francis C. K., Chollet, Jacques, Craft, J. Carl, Creek, Darren J., Dong, Yuxiang, Matile, Hugues, Maurer, Melanie, Morizzi, Julia, Nguyen, Tien, Papastogiannidis, Petros, Scheurer, Christian, Shackelford, David M., Sriraghavan, Kamaraj, Stingelin, Lukas, Tang, Yuanqing, Urwyler, Heinrich, Wang, Xiaofang, White, Karen L., Wittlin, Sergio, Zhou, Lin and Vennerstrom, Jonathan L. Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, *108*, (11), 4400-4405.
- Chatterjee, A, Ghosh, A K, Das, P C, Bhowmik, T and Banerji, J Raureflexine, an unusual bisindole alkaloid, *J. Indian Chem. Soc.*, **1998**, *75*, 695.
- Chawira, A. N., Warhurst, D. C., Robinson, B. L. and Peters, W. The effect of combinations of qinghaosu (artemisinin) with standard antimalarial drugs in the suppressive treatment of malaria in mice, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **1987**, *81*, (4), 554-558.

Chiaroni, A., Randriambola, L., Riche, C. and Husson, H. P. Structure of goniomine, an alkaloid of a new type biogenetically related to indole alkaloids. X-ray analysis of dihydrogoniomine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, (18), 5920-5921.

Chong, Curtis R., Chen, Xiaochun, Shi, Lirong, Liu, Jun O. and Sullivan, David J. A clinical drug library screen identifies astemizole as an antimalarial agent, *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, *2*, (8), 415-416.

Cordell, Geoffrey A. and Saxton, J. Edwin dans: *Chapter 1 Bisindole Alkaloids*, (Ed.: R. G. A. Rodrigo), Academic Press, **1982**, 1-295.

Cosledan, F., Fraisse, L., Pellet, A., Guillou, F., Mordmuller, B., Kreamsner, P. G., Moreno, A., Mazier, D., Maffrand, J. P. and Meunier, B. Selection of a trioxaquine as an antimalarial drug candidate, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, (45), 17579-17584.

Coteron, Jose M., Marco, María, Esquivias, Jorge, Deng, Xiaoyi, White, Karen L., White, John, Koltun, Maria, El Mazouni, Farah, Kokkonda, Sreekanth, Katneni, Kasiram, Bhamidipati, Ravi, Shackelford, David M., Angulo-Barturen, Inigo, Ferrer, Santiago B., Jiménez-Díaz, María Belén, Gamo, Francisco-Javier, Goldsmith, Elizabeth J., Charman, William N., Bathurst, Ian, Floyd, David, Matthews, David, Burrows, Jeremy N., Rathod, Pradipsinh K., Charman, Susan A. and Phillips, Margaret A. Structure-Guided Lead Optimization of Triazolopyrimidine-Ring Substituents Identifies Potent Plasmodium falciparum Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors with Clinical Candidate Potential, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, (15), 5540-5561.

Covello, Patrick S. Making artemisinin, *Phytochemistry*, **2008**, *69*, (17), 2881-2885.

Crosnier, Cecile, Bustamante, Leyla Y., Bartholdson, S. Josefin, Bei, Amy K., Theron, Michel, Uchikawa, Makoto, Mboup, Souleymane, Ndir, Omar, Kwiatkowski, Dominic P., Duraisingh, Manoj T., Rayner, Julian C. and Wright, Gavin J. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum, *Nature*, **2011**, *480*, (7378), 534-537.

Dao, Trong Tuan, Nguyen, Phi Hung, Won, Ho Keun, Kim, Eun Hee, Park, Junsoo, Won, Boo Yeon and Oh, Won Keun Curcuminoids from Curcuma longa and their inhibitory activities on influenza A neuraminidases, *Food. Chem.*, **2012**, *134*, (1), 21-28.

Das, B. C., Cosson, J. P., Lukacs, G. and Potier, P. Structural analysis by ¹³C NMR spectroscopy of pleiocorine, a new bisindole alkaloid from *van heurck et muell. arg*, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, *15*, (49-50), 4299-4302.

Das, Bhupesh C., Cosson, Jean Pierre and Lukacs, Gabor Structure analysis by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of pleiocraline, a new bisindole alkaloid from *Alstonia deplanchei van Heurck et Muell. Arg.* *J. Org. Chem.*, **1977**, *42*, (16), 2785-2786.

De Simone, Filippo, Gertsch, Jürg and Waser, Jérôme Catalytic Selective Cyclizations of Aminocyclopropanes: Formal Synthesis of Aspidospermidine and Total Synthesis of Goniomitine, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2010**, *49*, (33), 5767-5770.

Deharo, Eric and Ginsburg, Hagai Analysis of additivity and synergism in the anti-plasmodial effect of purified compounds from plant extracts, *Malaria. J.*, **2011**, *10*, (Suppl 1), S5.

Deng, Xiaoyi, Gujjar, Ramesh, El Mazouni, Farah, Kaminsky, Werner, Malmquist, Nicholas A., Goldsmith, Elizabeth J., Rathod, Pradipsinh K. and Phillips, Margaret A. Structural Plasticity of Malaria Dihydroorotate Dehydrogenase Allows Selective Binding of Diverse Chemical Scaffolds, *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, (39), 26999-27009.

Desjardins, R E, Canfield, C J, Haynes, J D and Chulay, J D Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique, *Antimicrob. Agents Chmother.*, **1979**, *16*, (6), 710-718.

Dewick, Paul M dans: *Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach 3rd Edition*, **2009**, 381.

Dewick, Paul M dans: *Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach 3rd Edition*, (Ed.: Wiley), Chichester, **2009**, 163-165.

Dondorp, Arjen M., Nosten, François, Yi, Poravuth, Das, Debashish, Phyo, Aung Phae, Tarning, Joel, Lwin, Khin Maung, Arie, Frederic, Hanpithakpong, Warunee, Lee, Sue J., Ringwald, Pascal, Silamut, Kamolrat, Imwong, Mallika, Chotivanich, Kesinee, Lim, Pharath, Herdman, Trent, An, Sen Sam, Yeung, Shunmay, Singhasivanon, Pratap, Day, Nicholas P. J., Lindegardh, Niklas, Socheat, Duong and White, Nicholas J. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria, *N. Eng. J. Med.*, **2009**, *361*, (5), 455-467.

Dong, Yuxiang, Wittlin, Sergio, Sriraghavan, Kamaraj, Chollet, Jacques, Charman, Susan A., Charman, William N., Scheurer, Christian, Urwyler, Heinrich, Santo Tomas, Josefina, Snyder, Christopher, Creek, Darren J., Morizzi, Julia, Koltun, Maria, Matile, Hugues, Wang, Xiaofang, Padmanilayam, Maniyan, Tang, Yuanqing, Dorn, Arnulf, Brun, Reto and Vennerstrom, Jonathan L. The Structure–Activity Relationship of the Antimalarial Ozonide Arterolane (OZ277), *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, (1), 481-491.

Dupont, Frédéric F. and Guignard, Jean-Louis dans: *Botanique, les familles de plantes*, Paris, **2012**, 227.

Ekland, Eric H. and Fidock, David A. In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes, *Int. J. Parasitol.*, **2008**, *38*, (7), 743-747.

Éles, János, Kalas, György, Szabó, Lajos, Lévai, Albert, Greiner, István, Kajtár-Perey, Mária, Szabó, Pál and Szántay, Csaba Synthesis of vinca alkaloids and related compounds 98. Oxidation with dimethyldioxirane of compounds containing the aspidospermane and quebrachamine ring system. A simple synthesis of (7S,20S)-(+)-rhazidigenine and (2R,7S,20S)-(+)-rhazidine, *J. Heterocycl. Chem.*, **2002**, *39*, (4), 767-771.

Endress, Mary and Bruyns, Peter A revised classification of the Apocynaceae s.l, *The Botanical Review*, **2000**, *66*, (1), 1-56.

Espuelas, S., Legrand, P., Loiseau, P. M., Bories, C., Barratt, G. and Irache, J. M. In Vitro Reversion of Amphotericin B Resistance in *Leishmania donovani* by Poloxamer 188, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, *44*, (8), 2190-2192.

Ettari, Roberta, Bova, Floriana, Zappalà, Maria, Grasso, Silvana and Micale, Nicola Falcipain-2 inhibitors, *Med. Res. Rev.*, **2010**, *30*, (1), 136-167.

Frederich, Michel, Tits, Monique and Angenot, Luc Potential antimalarial activity of indole alkaloids, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **2008**, *102*, (1), 11-19.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., M., Caricato, Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A., Kudin, K. N., Burant, J. C., Millam, M. J., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J. and Fox, D. J. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.

Furukawa, Hiroshi, Wu, TianShung and Ohta, Tomoko BISMURRAYAFOLINE-A AND -B, TWO NOVEL; DIMERIC; CARBAZOLE ALKALOIDS FROM MURRAYA EUCHRESTIFOLIA, *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, *31*, (11), 4202-4205.

Gagnon, David and Spino, Claude Stereoselective Synthesis of (+)-Aspidofractinine, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, (16), 6035-6041.

Gakunju, D M, Mberu, E K, Dossaji, S F, Gray, A I, Waigh, R D, Waterman, P G and Watkins, W M Potent antimalarial activity of the alkaloid nitidine, isolated from a Kenyan herbal remedy, *Antimicrob. Agents Chmother.*, **1995**, *39*, (12), 2606-2609.

Gamo, Francisco-Javier, Sanz, Laura M., Vidal, Jaume, de Cozar, Cristina, Alvarez, Emilio, Lavandera, Jose-Luis, Vanderwall, Dana E., Green, Darren V. S., Kumar, Vinod, Hasan, Samiul, Brown, James R., Peishoff, Catherine E., Cardon, Lon R. and Garcia-Bustos, Jose F. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification, *Nature*, **2010**, *465*, (7296), 305-310.

Gardner, Malcolm J., Hall, Neil, Fung, Eula, White, Owen, Berriman, Matthew, Hyman, Richard W., Carlton, Jane M., Pain, Arnab, Nelson, Karen E., Bowman, Sharen, Paulsen, Ian T., James, Keith, Eisen, Jonathan A., Rutherford, Kim, Salzberg, Steven L., Craig, Alister, Kyes, Sue, Chan, Man-Suen, Nene, Vishvanath, Shallom, Shamira J., Suh, Bernard, Peterson, Jeremy, Angiuoli, Sam, Perlea, Mihaela, Allen, Jonathan, Selengut, Jeremy, Haft, Daniel, Mather, Michael W., Vaidya, Akhil B., Martin, David M. A., Fairlamb, Alan H., Fraunholz, Martin J., Roos, David S., Ralph, Stuart A., McFadden, Geoffrey I., Cummings, Leda M., Subramanian, G. Mani, Mungall, Chris, Venter, J. Craig, Carucci, Daniel J., Hoffman, Stephen L., Newbold, Chris, Davis, Ronald W., Fraser, Claire M. and Barrell, Bart Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Nature*, **2002**, *419*, (6906), 498-511.

Gewali, Mohan B., Tezuka, Yasuhiro, Banskota, Arjun H., Ali, Mohammad Shawkat, Saiki, Ikuo, Dong, Hui and Kadota, Shigetoshi Epicalyxin F and Calyxin I: Two Novel Antiproliferative Diarylheptanoids from the Seeds of *Alpinia blepharocalyx*, *Org. Lett.*, **1999**, *1*, (11), 1733-1736.

Ginsburg, Hagai and Deharo, Eric A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments - an introduction, *Malaria J.*, **2011**, *10*, (Suppl 1), S1.

Gorman, A. A., Dastoor, N. J., Hesse, M., von Philipsborn, W., Renner, U. and Schmid, H. Über die Konstitution zweier neuartiger «dimerer» Indolalkaloide Pycnanthin und Pleiomutin 132. Mitteilung über Alkaloide, *Helv. Chim. acta.*, **1969**, *52*, (1), 33-55.

Govindachari, Tuticorin R., Sandhya, Gopalan, Chandrasekharan, Sundaram and Rajagopalan, Krishnamoorthy Voacinol: a new bisindole alkaloid from *Voacanga Grandifolia*(Miq) Rolfe, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1987**, (15), 1137-1138.

Graz, Bertrand, Willcox, Merlin L., Diakite, Chiaka, Falquet, Jacques, Dackuo, Florent, Sidibe, Oumar, Giani, Sergio and Diallo, Drissa Argemone mexicana decoction versus artesunate-amodiaquine for the management of malaria in Mali: policy and public-health implications, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **2010**, *104*, (1), 33-41.

Gross, E and Dreizler, R *Density Functional Theory II*, **1996**, *181*, 81-172.

Guiguemde, W. Armand, Shelat, Anang A, Garcia-Bustos, Jose F, Diagana, Thierry T., Gamo, Francisco-Javier and Guy, R. Kiplin Global Phenotypic Screening for Antimalarials, *Chem. Biol.*, **2012**, *19*, (1), 116-129.

Guiguemde, W. Armand, Shelat, Anang A., Bouck, David, Duffy, Sandra, Crowther, Gregory J., Davis, Paul H., Smithson, David C., Connelly, Michele, Clark, Julie, Zhu, Fangyi, Jiménez-Díaz, María B., Martínez, María S., Wilson, Emily B., Tripathi, Abhai K., Gut, Jiri, Sharlow, Elizabeth R., Bathurst, Ian, Mazouni, Farah El, Fowble, Joseph W., Forquer, Isaac, McGinley, Paula L., Castro, Steve, Angulo-Barturen, Iñigo, Ferrer, Santiago, Rosenthal, Philip J., DeRisi, Joseph L., Sullivan, David J., Lazo, John S., Roos, David S., Riscoe, Michael K., Phillips, Margaret A., Rathod, Pradipsinh K., Van Voorhis, Wesley C., Avery, Vicky M. and Guy, R. Kiplin Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*, *Nature*, **2010**, *465*, (7296), 311-315.

Harada, Nobuyuki and Nakanishi, Koji Exciton chirality method and its application to configurational and conformational studies of natural products, *Acc. Chem. Res.*, **1972**, *5*, (8), 257-263.

Harada, Nobuyuki, Saito, Akira, Ono, Hiroshi, Gawronski, Jacek, Gawronska, Krystyna, Sugioka, Tatsuo, Uda, Hisashi and Kuriki, Takeo A CD method for determination of the absolute stereochemistry of acyclic glycols. 1. Application of the CD exciton chirality method to acyclic 1,3-dibenzoate systems, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, (10), 3842-3850.

- He, Ya-Li, Chen, Wei-Ming and Feng, Xiao-Zhang Melomorsine, a New Dimeric Indoline Alkaloid from *Melodinus morsei*, *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, (3), 411-414.
- Heitzman, Mary E., Neto, Catherine C., Winiarz, Elizabeth, Vaisberg, Abraham J. and Hammond, Gerald B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae), *Phytochemistry*, **2005**, *66*, (1), 5-29.
- Henry, Thomas A. 415. The alkaloids of *Picalima Klaineana*, pierre. Part II, *J. Chem. Soc.*, **1932**, 2759-2768.
- Hootele, C., Levy, R., Kaisin, M., Pecher, J. and Martin, R. H. Indole Alkaloids XIII. The Structure of Jollyanine, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **1967**, *76*, (5-6), 300-307.
- Hori, Yumiko, Miura, Tsuyoshi, Hirai, Yasuaki, Fukumura, Motonori, Nemoto, Yukio, Toriizuka, Kazuo and Ida, Yoshiteru Pharmacognostic studies on ginger and related drugs--part 1: five sulfonated compounds from *Zingiberis rhizome* (Shokyo), *Phytochemistry*, **2003**, *62*, (4), 613-617.
- Hudson, A. T. Atovaquone — a novel broad-spectrum anti-infective drug, *Parasitol. Today*, **1993**, *9*, (2), 66-68.
- Ishida, Junko, Ohtsu, Hironori, Tachibana, Yoko, Nakanishi, Yuka, Bastow, Kenneth F., Nagai, Masahiro, Wang, Hui-Kang, Itokawa, Hideji and Lee, Kuo-Hsiung Antitumor Agents. Part 214: Synthesis and Evaluation of Curcumin Analogues as Cytotoxic Agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, (11), 3481-3487.
- Ito, Junitsu, Ghosh, Anil, Moreira, Luciano A., Wimmer, Ernst A. and Jacobs-Lorena, Marcelo Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite, *Nature*, **2002**, *417*, (6887), 452-455.
- Itoigawa, Masataka, Kashiwada, Yoshiki, Ito, Chihiro, Furukawa, Hiroshi, Tachibana, Yoko, Bastow, Kenneth F. and Lee, Kuo-Hsiung Antitumor Agents. 203. Carbazole Alkaloid Murrayaquinone A and Related Synthetic Carbazolequinones as Cytotoxic Agents1, *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, (7), 893-897.
- Jacquier, M. J., Vercauteren, J., Massiot, G., Le Men-Olivier, L., Pussett, J. and Sevenet, T. Alkaloids of *Alstonia plumosa*, *Phytochemistry*, **1980**, *21*, (12), 2973-2977.
- Jiang, Zhi-Hong, Tanaka, Takashi, Hirata, Haruko, Fukuoka, Reiko and Kouno, Isao Three diarylheptanoids from *Rhoiptelea chiliantha*, *Phytochemistry*, **1996**, *43*, (5), 1049-1054.
- Jones, Jeffrey R., Lebar, Matthew D., Jinwal, Umesh K., Abisambra, Jose F., Koren, John, Blair, Laura, O'Leary, John C., Davey, Zachary, Trotter, Justin, Johnson, Amelia G., Weeber, Edwin, Eckman, Christopher B., Baker, Bill J. and Dickey, Chad A. The Diarylheptanoid (+)-aR,11S-Myricanol and Two Flavones from Bayberry (*Myrica cerifera*) Destabilize the Microtubule-Associated Protein Tau, *J. Nat. Prod.*, **2010**, *74*, (1), 38-44.
- Judd, Walter S., Campbell, Christopher S., Kellogg, Elizabeth A. and Stevens, Peter dans: *Botanique systématique*, Paris, **2002**, 366.
- Kam, Toh-Seok and Choo, Yeun-Mun dans: *Chapter 4 Bisindole Alkaloids*, (Ed.: A. C. Geoffrey), Academic Press, **2006**, 181-337.
- Kam, Toh-Seok, Tan, Shin-Jowl, Ng, Seik-Weng and Komiyama, Kanki Bipleiophylline, an Unprecedented Cytotoxic Bisindole Alkaloid Constituted from the Bridging of Two Indole Moieties by an Aromatic Spacer Unit, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, (17), 3749-3752.
- Kamnaing, Pierre, Tsopmo, Apollinaire, Tanifum, Eric A., Tchuendem, Marguerite H. K., Tane, Pierre, Ayafor, Johnson F., Sterner, Olov, Rattendi, Donna, Iwu, Maurice M., Schuster, Brian and Bacchi, Cyrus Trypanocidal Diarylheptanoids from *Aframomum letestuanum*, *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, (3), 364-367.
- Kaschnitz, R. and Spittler, G. Anwendungen der Massenspektrometrie zur Strukturklärung von Alkaloiden, 7. Mitt.: Neue Alkaloide aus *Gonioma Kamassi* E. Mey, *Monatsh. Chem.*, **1965**, *96*, (3), 909-921.
- Keserü, G. M. and Nógrádi, M. dans: *The chemistry of natural diarylheptanoids*, (Ed.: R. Atta ur), Elsevier, **1995**, 357-394.

Khuzhaev, B., Aripova, S. and Shakirov, R. Arundine — A new dimeric alkaloid from the roots of *Arundo donax*, *Chem. Nat. Compd.*, **1994**, *30*, (5), 635-636.

Klayman, D. L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China, *Science*, **1985**, *228*, (4703), 1049-1055.

Knölker, Hans-Joachim and Reddy, Kethiri R. dans: *Chapter 3 Biogenesis of Carbazole Alkaloids*, (Ed.: A. C. Geoffrey), Academic Press, **2008**, 159-180.

Konno, Katsuhiko, Fujishima, Toshie, Liu, Zhaopeng and Takayama, Hiroaki Determination of absolute configuration of 1,3-diols by the modified Mosher's method using their di-MTPA esters, *Chirality*, **2002**, *14*, (1), 72-80.

Kumar Prasain, Jeevan, Tezuka, Yasuhiro, Li, Jian-Xin, Tanaka, Ken, Basnet, Purusotam, Dong, Hui, Namba, Tsuneo and Kadota, Shigetoshi Novel Diarylheptanoids from the Seeds of *Alpinia blepharocalyx*: Revised Structure of Calyxin A, *J. Chem. Res. (S)*, **1998**, (1), 22-23.

Kumar, Sushil, Gupta, S. K., Singh, Poorinima, Bajpai, Pratima, Gupta, M. M., Singh, Digvijay, Gupta, A. K., Ram, Govind, Shasany, A. K. and Sharma, Srikant High yields of artemisinin by multi-harvest of *Artemisia annua* crops, *Ind. Crop. Prod.*, **2004**, *19*, (1), 77-90.

Kusumi, Takenori, Ohtani, Ikuko, Inouye, Yoshinobu and Kakisawa, Hiroshi Absolute configurations of cytotoxic marine cembranolides; Consideration of Mosher's method, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, (37), 4731-4734.

Lacroix, Damien, Prado, Soizic, Deville, Alexandre, Krief, Sabrina, Dumontet, Vincent, Kasenene, John, Mouray, Elisabeth, Bories, Christian and Bodo, Bernard Hydroperoxy-cycloartane triterpenoids from the leaves of *Markhamia lutea*, a plant ingested by wild chimpanzees, *Phytochemistry*, **2009**, *70*, (10), 1239-1245.

Lamarck, Jean-Baptiste de Monet de dans: *Encyclopédie méthodique*, Paris, **1804**, 744.

Lavaud, C., Massiot, G., Vercauteren, J. and Le Men-olivier, L. Alkaloids of *Hunteria zeylanica*, *Phytochemistry*, **1982**, *21*, (2), 445-447.

Lee, Chengteh, Yang, Weitao and Parr, Robert G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B*, **1988**, *37*, (2), 785-789.

Lei, Sean Hsiang-lin From Changshan to a New Anti-Malarial Drug, *Soc. Stud. Sci.*, **1999**, *29*, (3), 323-358.

Lévesque, François and Seeberger, Peter H. Continuous-Flow Synthesis of the Anti-Malaria Drug Artemisinin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2012**, *51*, (7), 1706-1709.

Lien, Trinh Phuong, Kamperdick, Christine, Van Sung, Tran, Adam, Günter and Ripperger, Helmut Bis-indole alkaloids from *Tabernaemontana bovina*, *Phytochemistry*, **1998**, *49*, (6), 1797-1799.

Markgraf, F., Boiteau, P. Apocynacées : une espèce malgache du genre Sud-africain : *Gonioma*, *Adansonia*, **1972**, *12*, 223-229.

Marson, Charles M. New and unusual scaffolds in medicinal chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, (11), 5514-5533.

Marti, Guillaume, Eparvier, Véronique, Moretti, Christian, Susplugas, Sophie, Prado, Soizic, Grellier, Philippe, Retailleau, Pascal, Guéritte, Françoise and Litaudon, Marc Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae), *Phytochemistry*, **2009**, *70*, (1), 75-85.

Martin-Cordero, Carmen, López-Lázaro, Miguel, Agudo, María Angeles, Navarro, Eduardo, Trujillo, Juan and Jesús Ayuso, María A cytotoxic diarylheptanoid from *Viscum cruciatum*, *Phytochemistry*, **2001**, *58*, (4), 567-569.

http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map&kind=Pyrostria, 30/04/2012

Mboya-Okeyo, Tom, Ridley, Robert G. and Nwaka, Solomon The African Network for Drugs and Diagnostics Innovation, *The Lancet*, **2009**, *373*, (9674), 1507-1508.

McPhail, Andrew T., Hagaman, Edward W., Kunesch, Nicole, Wenkert, Ernest and Poisson, Jacques The structure of callichiline, *Tetrahedron*, **1983**, *39*, (22), 3629-3637.

Mehri, H., Baassou, S. and Plat, M. Methylene-10,10'bis[(+)-Na-norvallesamidine], Dichlorure de Methylene Nb,Nb'[Bis(+)-meloninium], Chlorures de Nb'-Chloromethyl Celastromelinium et Celastromelidinium: Alcaloïdes Dimères, Artefacts Possibles d'Extraction de *Melodinus celastroides*, *J. Nat. Prod.*, **1991**, *54*, (2), 372-379.

Mesia, Kahunu, Cimanga, Richard K., Dhoooghe, Liene, Cos, Paul, Apers, Sandra, Totté, Jozef, Tona, Gaston L., Pieters, Luc, Vlietinck, Arnold J. and Maes, Louis Antimalarial activity and toxicity evaluation of a quantified *Nauclea pobeguini* extract, *J. Ethnopharmacol.*, **2010**, *131*, (1), 10-16.

Meunier, Bernard Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action: Dream or Reality?, *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *41*, (1), 69-77.

Meunier, Bernard and Robert, Anne Heme as Trigger and Target for Trioxane-Containing Antimalarial Drugs†, *Acc. Chem. Res.*, **2010**, *43*, (11), 1444-1451.

Meunier, Bernard Les molécules hybrides comme stratégie de création de nouveaux agents anti-infectieux, *Cr. Chim.*, **2011**, *14*, (4), 400-405.

Meyer, Ernest Heinrich Friedrich *Comm. Pl. Afr. Austr.*, **1837**, *188*,

Michalak, K., Wesolowska, O., Motohashi, N. and Hendrich, A. dans: *The Role of the Membrane Actions of Phenothiazines and Flavonoids as Functional Modulators*, (Ed.: S. Eguchi), Springer, Berlin / Heidelberg, **2007**, 223-302.

Milobędzka, J., v. Kostanecki, St and Lampe, V. Zur Kenntnis des Curcumins, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1910**, *43*, (2), 2163-2170.

Min-Won, Lee, Tanaka, Takashi, Nonaka, Gen-Ichiro and Nishioka, Itsuo Hirsutin, an ellagitannin with a diarylheptanoid moiety, from *Alnus hirsuta* var. *Microphylla*, *Phytochemistry*, **1992**, *31*, (3), 967-970.

Mizutani, Masaya, Inagaki, Fuyuhiko, Nakanishi, Takeo, Yanagihara, Chihiro, Tamai, Ikumi and Mukai, Chisato Total Syntheses of (-)- and (+)-Goniomitine, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, (7), 1796-1799.

<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/gentianalesweb.htm>,

27/04/2012

<http://www.tropicos.org/Name/27906943>, **29/04/2012**

Moffitt, William, Woodward, R. B., Moscovitz, A., Klyne, W. and Djerassi, Carl Structure and the Optical Rotatory Dispersion of Saturated Ketones, *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, (19), 4013-4018.

Mohamadi, Fariborz, Richards, Nigel G. J., Guida, Wayne C., Liskamp, Rob, Lipton, Mark, Caufield, Craig, Chang, George, Hendrickson, Thomas and Still, W. Clark Macromodel—an integrated software system for modeling organic and bioorganic molecules using molecular mechanics, *J. Comput. Chem.*, **1990**, *11*, (4), 440-467.

Morales, Christian L. and Pagenkopf, Brian L. Total Synthesis of (+)-Goniomitine via a Formal Nitrile/Donor–Acceptor Cyclopropane [3 + 2] Cyclization, *Org. Lett.*, **2007**, *10*, (2), 157-159.

Morikawa, Toshio, Tao, Jing, Toguchida, Iwao, Matsuda, Hisashi and Yoshikawa, Masayuki Structures of New Cyclic Diarylheptanoids and Inhibitors of Nitric Oxide Production from Japanese Folk Medicine *Acer nikoense*1, *J. Nat. Prod.*, **2002**, *66*, (1), 86-91.

Muñoz-Durango, Katalina, Maciuk, Alexandre, Harfouche, Abha, Torijano-Gutiérrez, Sandra, Jullian, Jean-Christophe, Quintin, Jérôme, Spelman, Kevin, Mouray, Elisabeth, Grellier, Philippe and Figadère, Bruno Detection, Characterization, and Screening of Heme-Binding Molecules by Mass Spectrometry for Malaria Drug Discovery, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, (7), 3324-3329.

Newman, David J. and Cragg, Gordon M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.*, **2012**, 75, (3), 311-335.

Nordman, C. E. and Kumra, S. K. The Structure of Villalstonine1, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, (9), 2059-2060.

Nosten, F., van Vugt, M., Price, R., Luxemburger, C., Thway, K. L., Brockman, A., McGready, R., ter Kuile, F., Looareesuwan, S. and White, N. J. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study, *The Lancet*, **2000**, 356, (9226), 297-302.

Nugroho, Alfarius E., Hirasawa, Yusuke, Hosoya, Takahiro, Awang, Khalijah, Hadi, A. Hamid A. and Morita, Hiroshi Bisleucocurine A, a novel bisindole alkaloid from *Leuconotis griffithii*, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, (19), 2589-2592.

Ohta, Shinji, Koyama, Mika, Aoki, Tadashi and Suga, Takayuki Absolute Configuration of Platyphylloside and (-)-Centrololol, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, 58, 2423-2424.

Olliaro, P. and Wells, T. N. C. The Global Portfolio of New Antimalarial Medicines Under Development, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2009**, 85, (6), 584-595.

World Health Organization Guidelines for the Treatment of Malaria, **2006**

World Malaria Report de http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/fr/ (Organisation Mondiale de la Santé), **2011**

Payne, David J., Gwynn, Michael N., Holmes, David J. and Pompliano, David L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2007**, 6, (1), 29-40.

Penna-Coutinho, Julia, Cortopassi, Wilian Augusto, Oliveira, Aline Alves, França, Tanos Celmar Costa and Krettli, Antoniana Ursine Antimalarial Activity of Potential Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase Enzyme Selected by Docking Studies, *PLoS One*, **2011**, 6, (7), e21237.

Per, Claeson, Claeson, Ubonwan P., Tuchinda, Patoomratana and Reutrakul, Vichai dans: *Occurrence, structure and bioactivity of 1,7-diarylheptanoids*, (Ed.: R. Atta ur), Elsevier, **2002**, 881-908.

Pescitelli, Gennaro, Di Bari, Lorenzo and Berova, Nina Conformational aspects in the studies of organic compounds by electronic circular dichroism, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, (9), 4603-4625.

Plouffe, David, Brinker, Achim, McNamara, Case, Henson, Kerstin, Kato, Nobutaka, Kuhlen, Kelli, Nagle, Advait, Adrián, Francisco, Matzen, Jason T., Anderson, Paul, Nam, Taegy, Gray, Nathanael S., Chatterjee, Arnab, Janes, Jeff, Yan, S. Frank, Trager, Richard, Caldwell, Jeremy S., Schultz, Peter G., Zhou, Yingyao and Winzeler, Elizabeth A. In silico activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, (26), 9059-9064.

Polak, E. and Ribiere, G. Note sur la convergence de méthodes de directions conjuguées, *Rev. Fr. Inf. Rech. Oper.*, **1969**, 16, 35-43.

Rabaron, A., Plat, M. and Potier, P. Alcaloïdes de *Catharanthus Longifolius* (Pichon) Pich. Isolement d'un alcaloïde dimère : la Vindolicine, *Plant. Med. Phytother.*, **1973**, 7, (1), 53-58.

Rahman, KM Wahidur, Ali, Shadan, Aboukameel, Amro, Sarkar, Sanila H., Wang, Zhiwei, Philip, Philip A., Sakr, Wael A. and Raz, Avraham Inactivation of NF- κ B by 3,3'-diindolylmethane contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agent in breast cancer cells, *Mol. Cancer Ther.*, **2007**, 6, (10), 2757-2765.

Randriambola, L., Quirion, J. C., Kan-Fan, C. and Husson, H. P. Structure of goniomitine, a new type of indole alkaloid, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, (19), 2123-2126.

Rasmussen, Hasse Bonde, Christensen, Søren Brøgger, Kvist, Lars Peter and Karazmi, Arzalan A Simple and Efficient Separation of the Curcumins, the Antiprotozoal Constituents of *Curcuma longa*, *Planta. Med.*, **2000**, 66, (04), 396-398.

Rasoanaivo, Philippe and Lukacs, Gabor Carbon-13 nuclear magnetic resonance of natural and related products. XXI. Revision of the structure of the bisindole alkaloid 14',15'-

dihydropycnanthine. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study, *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, (2), 376-378.

Razafimandimbison, Sylvain G., Lantz, Henrik, Mouly, Arnaud and Bremer, Birgitta Evolutionary Trends, Major Lineages, and New Generic Limits in the Dioecious Group of the Tribe Vanguerieae (Rubiaceae): Insights into the Evolution of Functional Dioecy1, *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **2009**, *96*, (1), 161-181.

Reil, Ellen, Höfle, Gerhard, Draber, Wilfried and Oettmeier, Walter Quinolones and their N-oxides as inhibitors of mitochondrial complexes I and III, *Biochmi. Biophys. Acta.*, **1997**, *1318*, (1-2), 291-298.

Ridley, Robert G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs, *Nature*, **2002**, *415*, (6872), 686-693.

Robert, A., Benoit-Vical, F., Claparols, Catherine and Meunier, B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, (38), 13676-13680.

Robert, Anne, Dechy-Cabaret, Odile, Cazelles, Jérôme and Meunier, Bernard From Mechanistic Studies on Artemisinin Derivatives to New Modular Antimalarial Drugs, *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, (3), 167-174.

Rosenthal, P. Cysteine proteases of malaria parasites, *Int. J. Parasitol.*, **2004**, *34*, (13-14), 1489-1499.

Rosenthal, P.J. Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2011**, *712*, 30-48.

Rottmann, M., McNamara, C., Yeung, B. K. S., Lee, M. C. S., Zou, B., Russell, B., Seitz, P., Plouffe, D. M., Dharia, N. V., Tan, J., Cohen, S. B., Spencer, K. R., Gonzalez-Paez, G. E., Lakshminarayana, S. B., Goh, A., Suwanarusk, R., Jegla, T., Schmitt, E. K., Beck, H. P., Brun, R., Nosten, F., Renia, L., Dartois, V., Keller, T. H., Fidock, D. A., Winzeler, E. A. and Diagana, T. T. Spiroindolones, a Potent Compound Class for the Treatment of Malaria, *Science*, **2010**, *329*, (5996), 1175-1180.

S.-I.Uehara, I. Yasuda, K. Akiyama, H. Morita, K. Takeya and Itokawa, H. Diarylheptanoids from the Rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza* and *Alpinia officinarum*, *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, *35*, 3298.

Sakai, S., Aimi, N., Yamaguchi, K., Yamanaka, E. and Haginiwa, J. Gardneria alkaloids -X structure of gardmultine, a novel the bisindole alkaloid, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *16*, (10), 719-722.

Scott, A. Ian Biogenetic-type synthesis of the indole alkaloids, *Bioorg. Chem.*, **1974**, *3*, (4), 398-429.

Seco, José Manuel, Martino, Marco, Quiñoá, Emilio and Riguera, Ricardo Absolute Configuration of 1,n-Diols by NMR: The Importance of the Combined Anisotropic Effects in Bis-Arylmethoxyacetates, *Org. Lett.*, **2000**, *2*, (21), 3261-3264.

Sharma, Raman, Lawrenson, Alexandre S., Fisher, Nicholas E., Warman, Ashley J., Shone, Alison E., Hill, Alasdair, Mbekeani, Alison, Pidathala, Chandrakala, Amewu, Richard K., Leung, Suet, Gibbons, Peter, Hong, David W., Stocks, Paul, Nixon, Gemma L., Chadwick, James, Shearer, Joanne, Gowers, Ian, Cronk, David, Parel, Serge P., O'Neill, Paul M., Ward, Stephen A., Biagini, Giancarlo A. and Berry, Neil G. Identification of Novel Antimalarial Chemotypes via Chemoinformatic Compound Selection Methods for a High-Throughput Screening Program against the Novel Malarial Target, PfNDH2: Increasing Hit Rate via Virtual Screening Methods, *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, (7), 3144-3154.

Sheetz, Michael P. and Singer, S. J. Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1974**, *71*, (11), 4457-4461.

Simplice D. Karou, Tchadjobo Tchacondo, Denise P. Ilboudo and Simpire, Jacques Sub-Saharan Rubiaceae: A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry and Biological Activities, *Pak. J. Biol. Sci.*, **2011**, *14*, (3), 149-169.

Singh, B, Sung, LK, Matusop, A, Radhakrishnan, A, Shamsul, SSG, Cox-Singh, J, Thomas, AW and Conway, D A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings, *Lancet*, **2004**, *363*, 1017-1024.

Smol, John P. Climate Change: A planet in flux, *Nature*, **2012**, *483*, (7387), S12-S15.

Spiteller-Friedmann, M., Kaschnitz, R., Spiteller, G., Chatterjee, A., Adityachaudhury, N. and Ganguli, G. Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden. 4. Mitt.: Zur Struktur des Rhazidins, *Monatsh. Chem.*, **1964**, *95*, (4), 1228-1233.

Still, W. Clark, Tempczyk, Anna, Hawley, Ronald C. and Hendrickson, Thomas Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, (16), 6127-6129.

Sullivan, D. J. Plasmodium Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins, *Science*, **1996**, *271*,

Sun, Yi, Matsubara, Hideki, Kitanaka, Susumu and Yasukawa, Ken Diarylheptanoids from the Rhizomes of *Alpinia officinarum*, *Helv. Chim. acta.*, **2008**, *91*, (1), 118-123.

Swinney, David C. and Anthony, Jason How were new medicines discovered?, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2011**, *10*, (7), 507-519.

Takano, Seiichi, Sato, Tsutomu, Inomata, Kohei and Ogasawara, Kunio The enantiocontrolled total synthesis of natural (-)-goniomitine, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1991**, (7), 462-464.

Tatsuzo, Fujii, Takashi, Sato, Akira, Tamura, Motoko, Wakatsuki and Yasunori, Kanaho Shape changes of human erythrocytes induced by various amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells, *Biochem. Pharmacol.*, **1979**, *28*, (5), 613-620.

Tempête, C., Werner, G. H., Favre, F., Rojas, A. and Langlois, N. In vitro cytostatic activity of 9-demethoxyprothramycin B, *Eur. J. Med. Chem.*, **1995**, *30*, (7-8), 647-650.

Tezuka, Yasuhiro, Ali, Mohammad S., Banskota, Arjun H. and Kadota, Shigetoshi Blepharocalyxins C–E: three novel antiproliferative diarylheptanoids from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, (31), 5903-5907.

Tezuka, Yasuhiro, Gewali, Mohan B., Ali, Mohammad Shawkat, Banskota, Arjun H. and Kadota, Shigetoshi Eleven Novel Diarylheptanoids and Two Unusual Diarylheptanoid Derivatives from the Seeds of *Alpinia blepharocalyx*, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, (2), 208-213.

Trager, W and Jensen, JB Human malaria parasites in continuous culture, *Science*, **1976**, *193*, (4254), 673-675.

Van Beek, Teris A., Verpoorte, Robert, Svendsen, Anders Baerheim and Fokkens, Roel Antimicrobially Active Alkaloids from *Tabernaemontana chippii*, *J. Nat. Prod.*, **1985**, *48*, (3), 400-423.

Veluri, Ravikanth, Oka, Imelda, Wagner-Döbler, Irene and Laatsch, Hartmut New Indole Alkaloids from the North Sea Bacterium *Vibrio parahaemolyticus* Bio2491, *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, (11), 1520-1523.

Vennerstrom, Jonathan L., Arbe-Barnes, Sarah, Brun, Reto, Charman, Susan A., Chiu, Francis C. K., Chollet, Jacques, Dong, Yuxiang, Dorn, Arnulf, Hunziker, Daniel, Matile, Hugues, McIntosh, Kylie, Padmanilayam, Maniyan, Santo Tomas, Josefina, Scheurer, Christian, Scorneaux, Bernard, Tang, Yuanqing, Urwyler, Heinrich, Wittlin, Sergio and Charman, William N. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate, *Nature*, **2004**, *430*, (7002), 900-904.

Medicines for Malaria Venture, Global Antimalarial Portfolio (<http://www.mmv.org/research-development/science-portfolio>), **2012**

Verpoorte, Rob Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development, *Drug Discovery Today*, **1998**, *3*, (5), 232-238.

Weissbuch, Isabelle and Leiserowitz, Leslie Interplay Between Malaria, Crystalline Hemozoin Formation, and Antimalarial Drug Action and Design, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, (11), 4899-4914.

Wells, T. N. C. and Gutteridge, Winston E. dans: *Malaria: New Medicines for its Control and Eradication*, (Ed.: M. J. P. a. T. N. C. Wells), RSC, Geneva, **2012**, 1-31.

Wells, Timothy Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots?, *Malaria. J.*, **2011**, *10*, (Suppl 1), S3.

Wells, Timothy N. C., Alonso, Pedro L. and Gutteridge, Winston E. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2009**, *8*, (11), 879-891.

White, Nicholas J. Malaria — Time to Act, *N. Eng. J. Med.*, **2006**, *355*, (19), 1956-1957.

Wright, Colin W. Recent developments in research on terrestrial plants used for the treatment of malaria, *Nat. Prod. Rep.*, **2010**, *27*, (7), 961-968.

Xiao, Yun Chuan, Xie, Jing, Yu, Min, Liu, Miao, Ran, Jian, Xi, Zhen, Li, Wei and Huang, Jing Bisabocurcumin, a new skeleton curcuminoid from the rhizomes of *Curcuma longa* L, *Chinese. Chem. Lett.*, **2011**, *22*, (12), 1457-1460.

Xu, Min, Andrews, Kathy T., Birrell, Geoff W., Tran, Truc Linh, Camp, David, Davis, Rohan A. and Quinn, Ronald J. Psammaphysin H, a new antimalarial bromotyrosine alkaloid from a marine sponge of the genus *Pseudoceratina*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, (2), 846-848.

Yagi, H., Akagi, H., Thakker, D. R., Mah, H. D., Koreeda, M. and Jerina, D. M. Absolute stereochemistry of the highly mutagenic 7,8-diol 9,10-epoxides derived from the potent carcinogen trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, (7), 2358-2359.

Yang, Ye, Kinoshita, Kaoru, Koyama, Kiyotaka, Takahashi, Kunio, Tai, Takaaki, Nunoura, Yoshiki and Watanabe, Kazuo Two Novel Anti-emetic Principles of *Alpinia katsumadai*, *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, (12), 1672-1674.

Yin, Jun, Kouda, Kyoji, Tezuka, Yasuhiro, Le Tran, Quan, Miyahara, Tatsuro, Chen, Yingjie and Kadota, Shigetoshi New Diarylheptanoids from the Rhizomes of *Dioscorea spongiosa* and Their Antiosteoporotic Activity, *Planta. Med.*, **2004**, *70*, (01), 54-58.

Yokosuka, Akihito, Mimaki, Yoshihiro, Sakagami, Hiroshi and Sashida, Yutaka New Diarylheptanoids and Diarylheptanoid Glucosides from the Rhizomes of *Tacca chantrieri* and Their Cytotoxic Activity, *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, (3), 283-289.

Yonezawa, Takayuki, Lee, Ji-Won, Akazawa, Hiroyuki, Inagaki, Masahiko, Cha, Byung-Yoon, Nagai, Kazuo, Yagasaki, Kazumi, Akihisa, Toshihiro and Woo, Je-Tae Osteogenic activity of diphenyl ether-type cyclic diarylheptanoids derived from *Acer nikoense*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, (11), 3248-3251.

Zaima, Kazumasa, Hirata, Tomoko, Hosoya, Takahiro, Hirasawa, Yusuke, Koyama, Koichiro, Rahman, Abdul, Kusumawati, Idha, Zaini, Noor Cholies, Shiro, Motoo and Morita, Hiroshi Biscarpamontamines A and B, an *Aspidosperma*-*Iboga* Bisindole Alkaloid and an *Aspidosperma*-*Aspidosperma* Bisindole Alkaloid, from *Tabernaemontana sphaerocarpa*, *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72*, (9), 1686-1690.

Zhao, Ling, Liang, Jing Yu, Zhang, Jing Yu and Chen, Yun A novel diarylheptanoid bearing flavonol moiety from the rhizomes of *Alpinia officinarum* Hance, *Chinese. Chem. Lett.*, **2010**, *21*, (2), 194-196.

Zhao, Ning, Zhou, Peng, Berova, Nina and Nakanishi, Koji Combined synthetic/CD strategy for the preparation and configurational assignments of model acyclic 1,3-polyols with a 1,2-diol terminal, *Chirality*, **1995**, *7*, (8), 636-651.

Ziegler, Hanne L., Staerk, Dan, Christensen, Jette, Hviid, Lars, Hagerstrand, Henry and Jaroszewski, Jerzy W. In Vitro *Plasmodium falciparum* Drug Sensitivity Assay: Inhibition of Parasite Growth by Incorporation of Stomatocytogenic Amphiphiles into the Erythrocyte Membrane, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, *46*, (5), 1441-1446.

Annexes

Annexe 1 : Arbre phylogénétique des angiospermes (APG III)

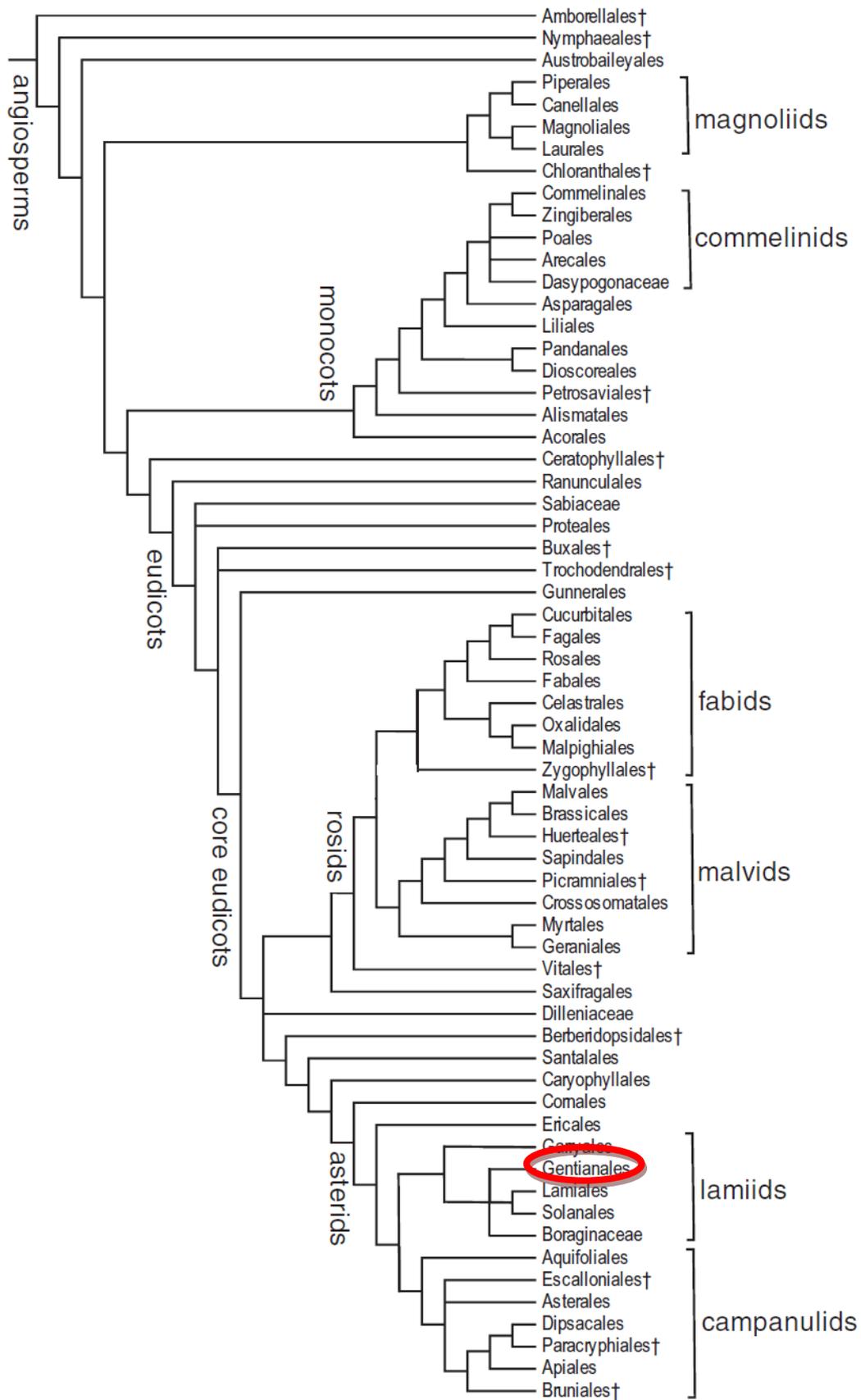
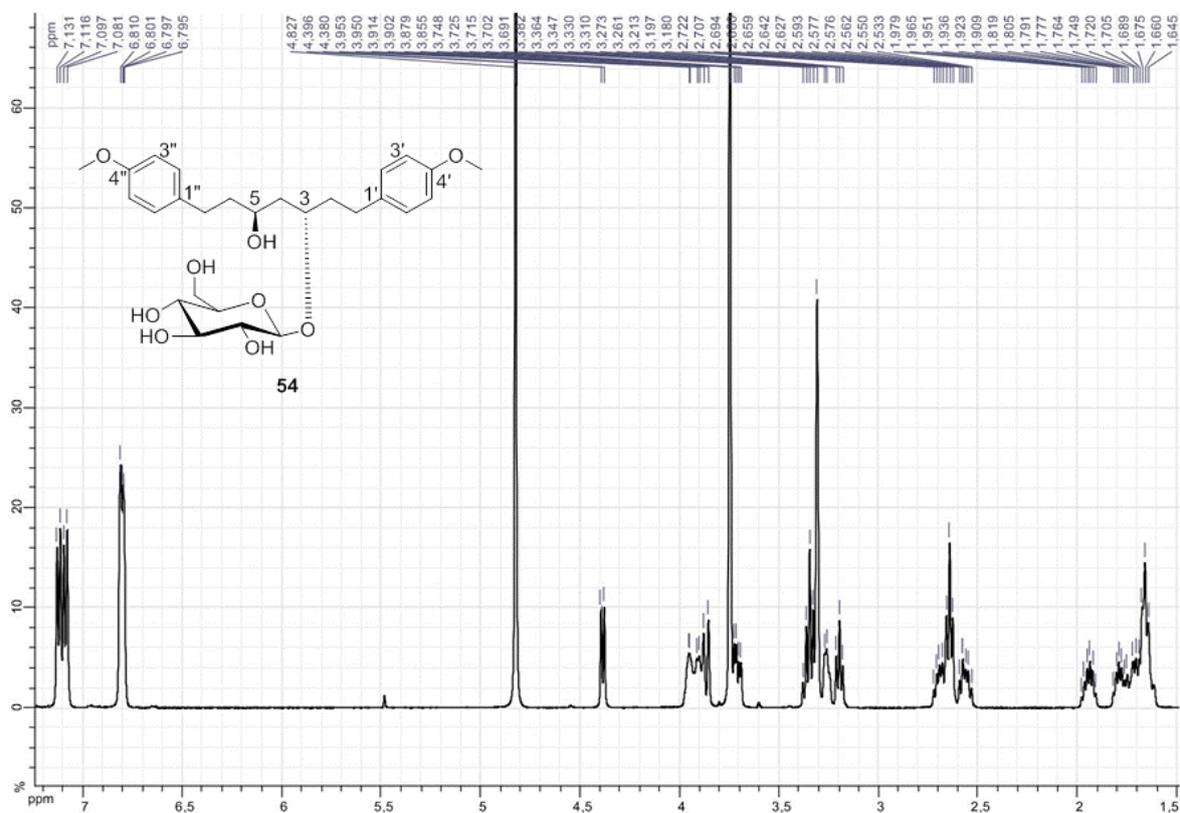


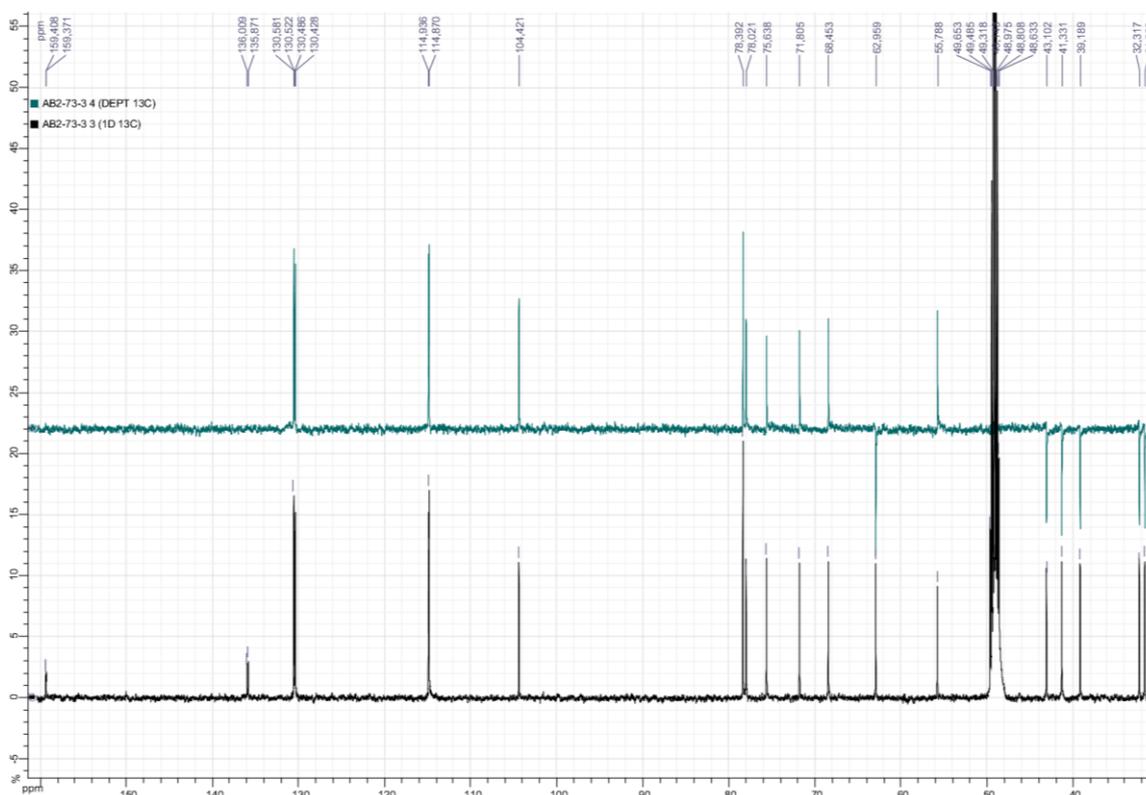
Figure 141. Arbre phylogénétique des angiospermes⁷⁷

Annexe 2 : Spectres RMN 1D (^1H , ^{13}C et DEPT-135) et 2D (COSY, HMQC et HMBC) du composé 54

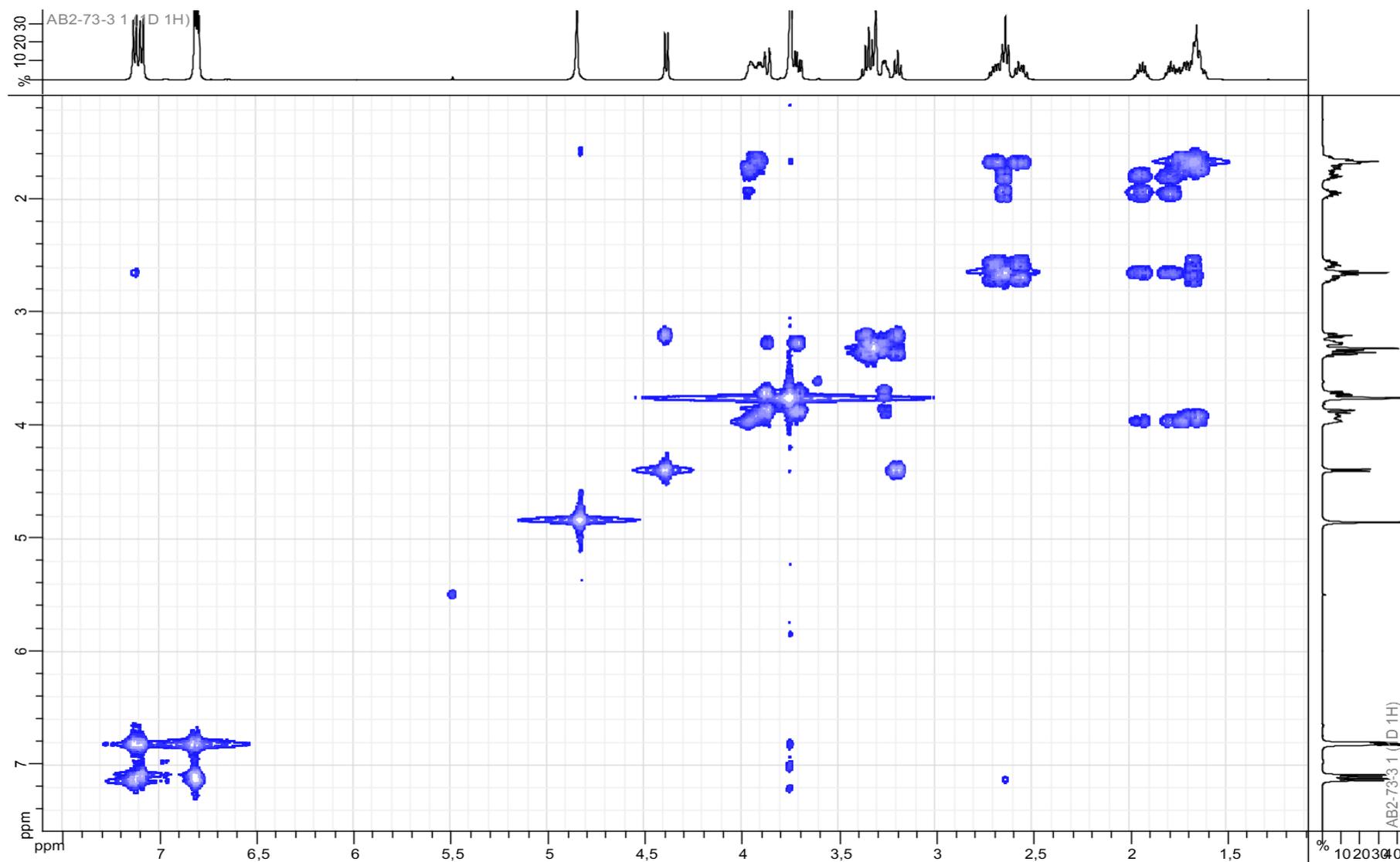
Spectre RMN ^1H du composé **54** à 500 MHz dans le CD_3OD .



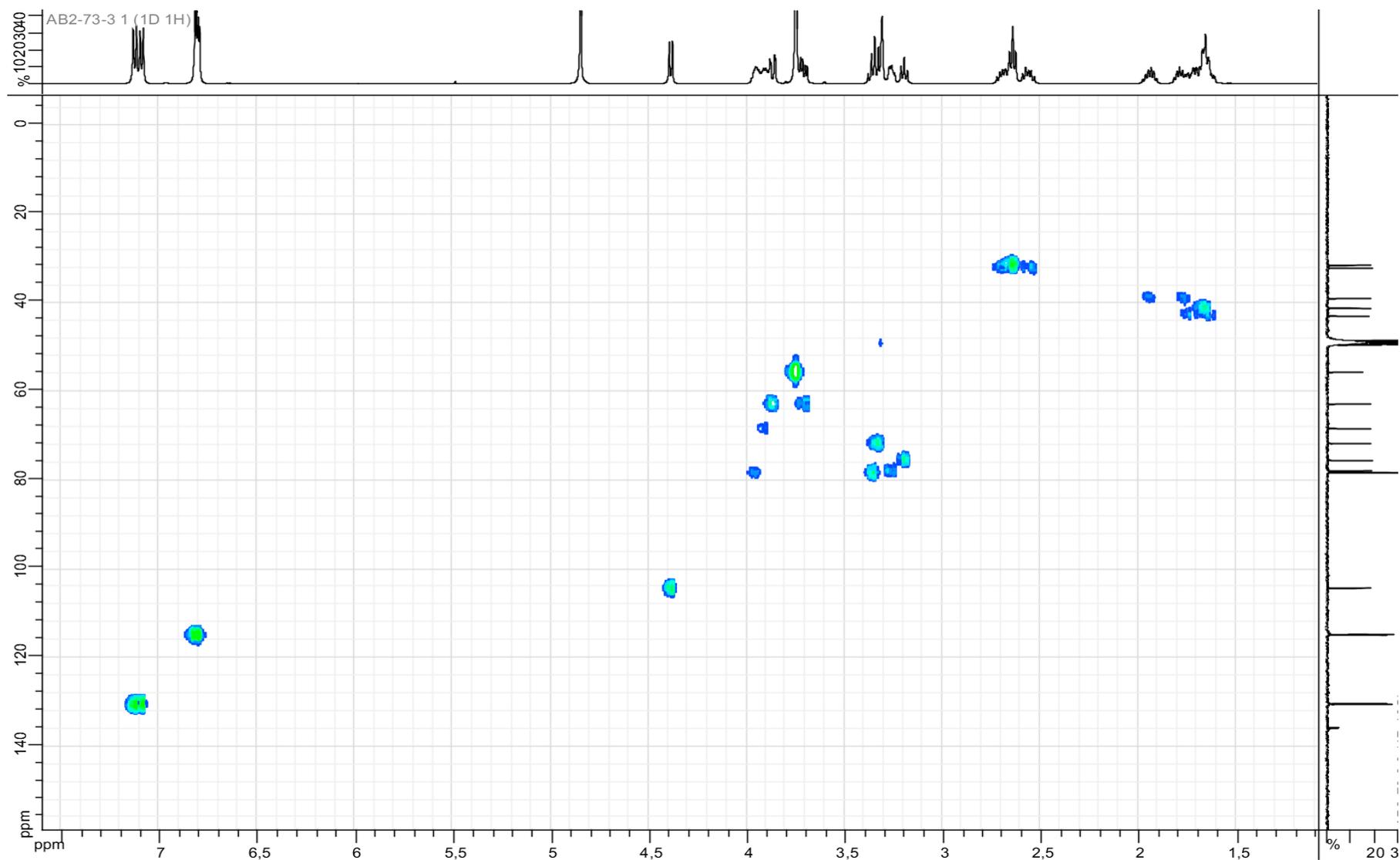
Spectre RMN ^{13}C et DEPT 135 du composé **54** à 125 MHz dans le CD_3OD .



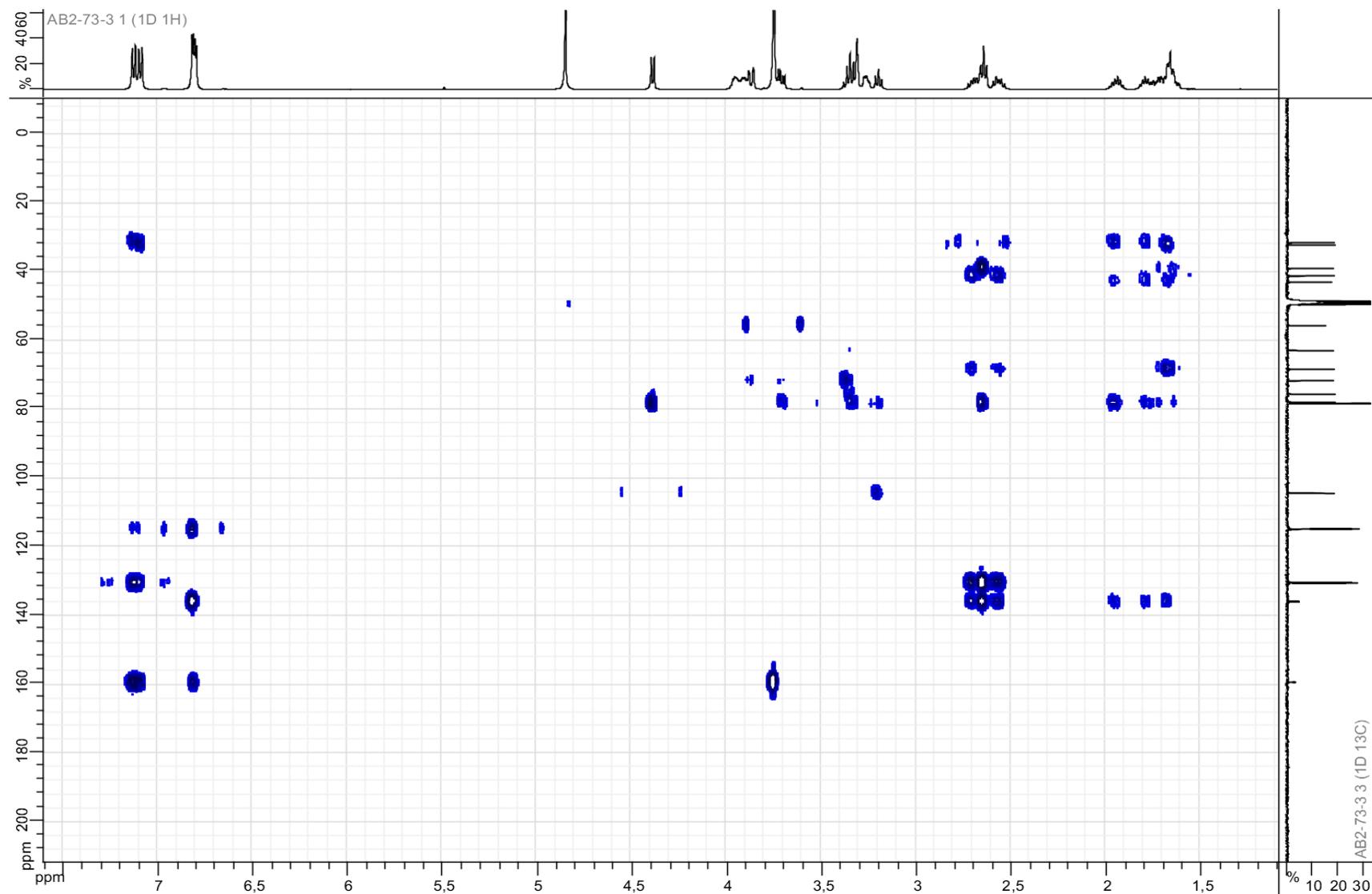
Spectre COSY du composé **54** à 500 MHz dans le CD₃OD.



Spectre HMQC du composé **54** à 500 MHz dans le CD₃OD.

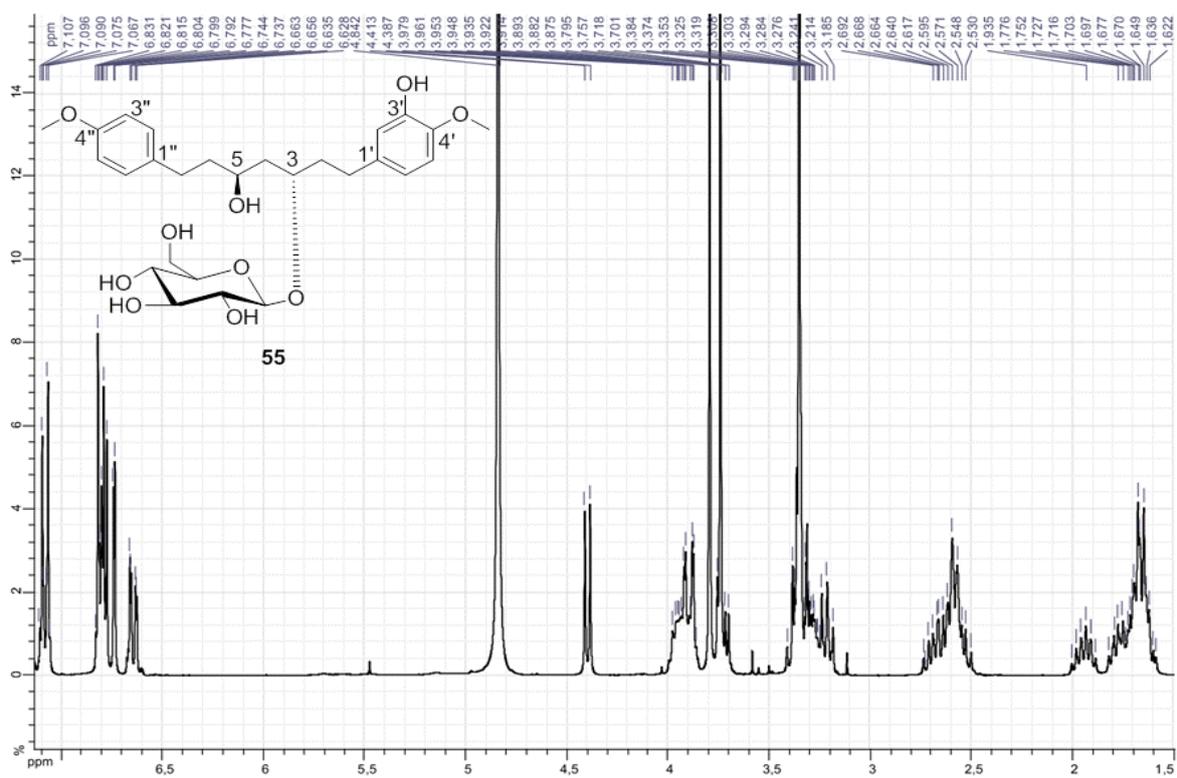


Spectre HMBC du composé **54** à 500 MHz dans le CD₃OD.

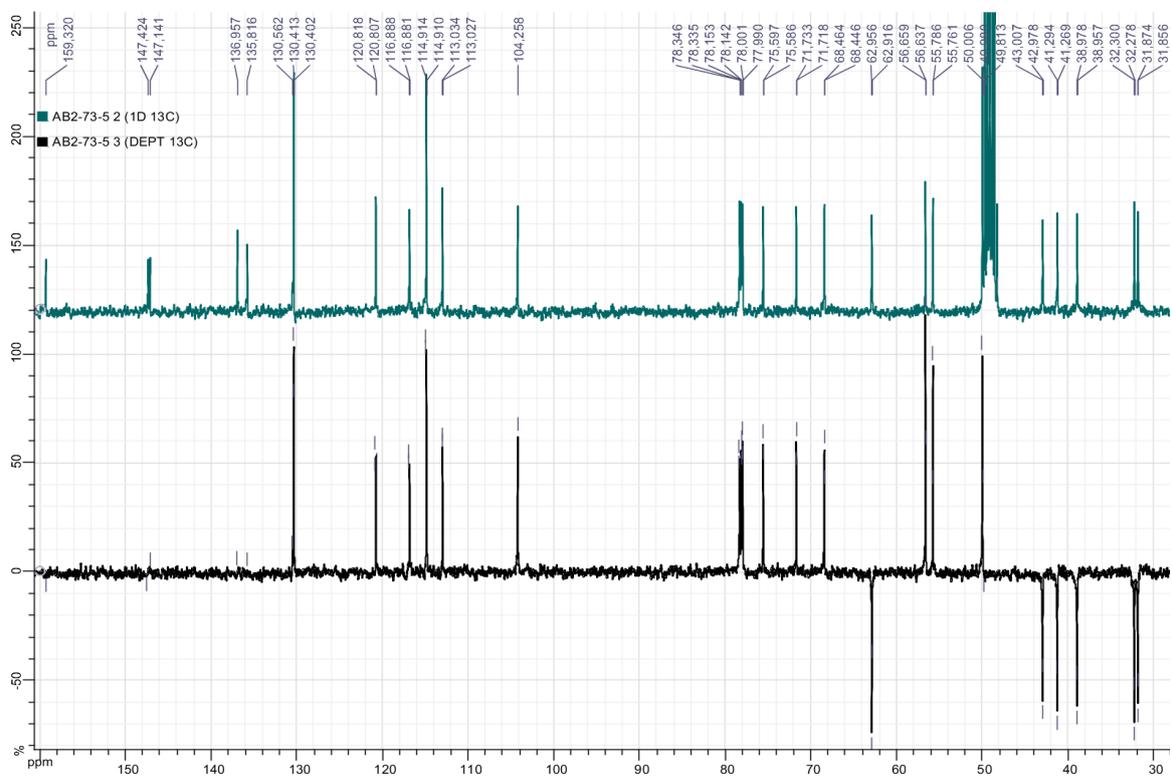


Annexe 3 : Spectres RMN ^1H , ^{13}C et DEPT-135 des composés 55-61 et Spectre NOESY du composé 59

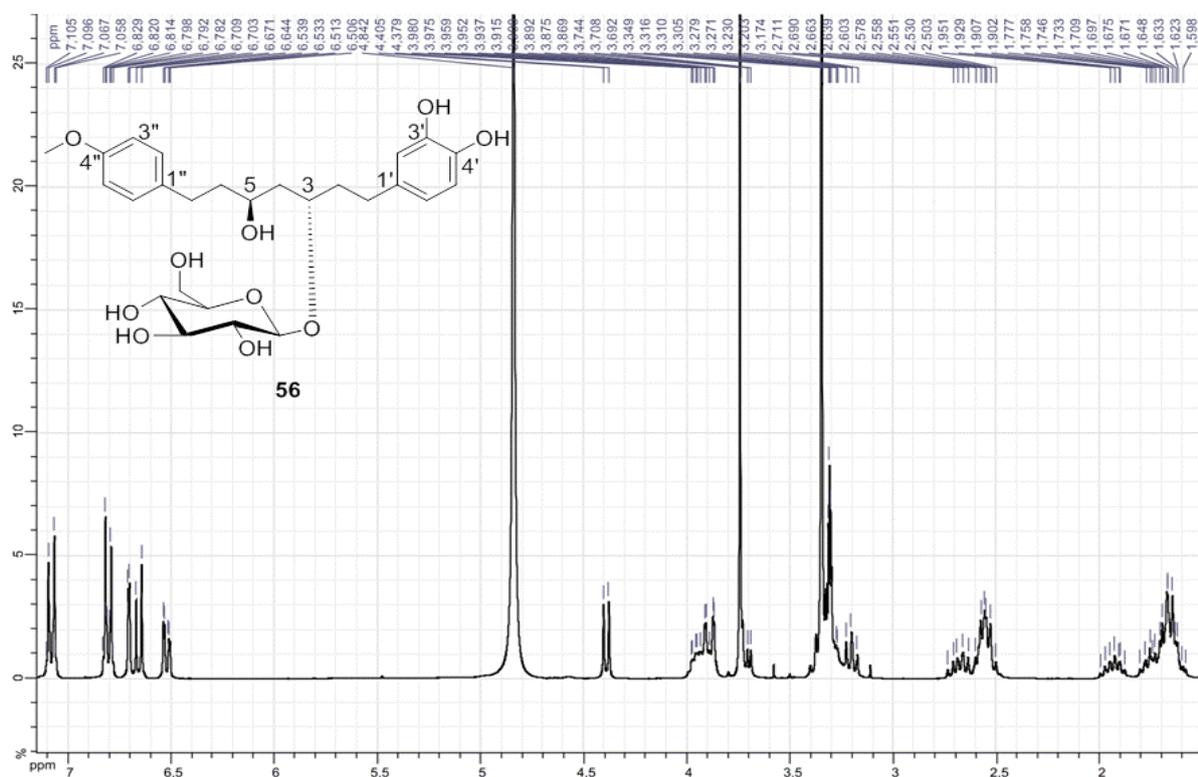
Spectre RMN ^1H du composé **55** à 300 MHz dans le CD_3OD .



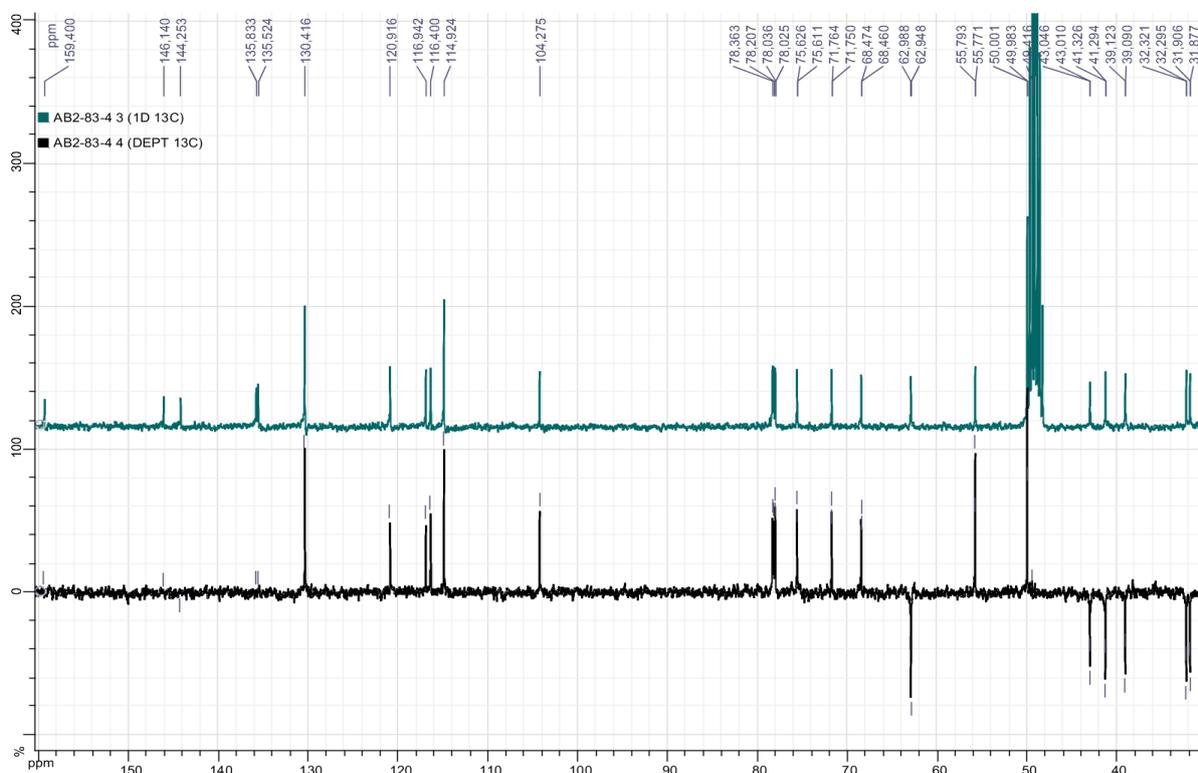
Spectres RMN ^{13}C et DEPT 135 du composé **55** à 75 MHz dans le CD_3OD .



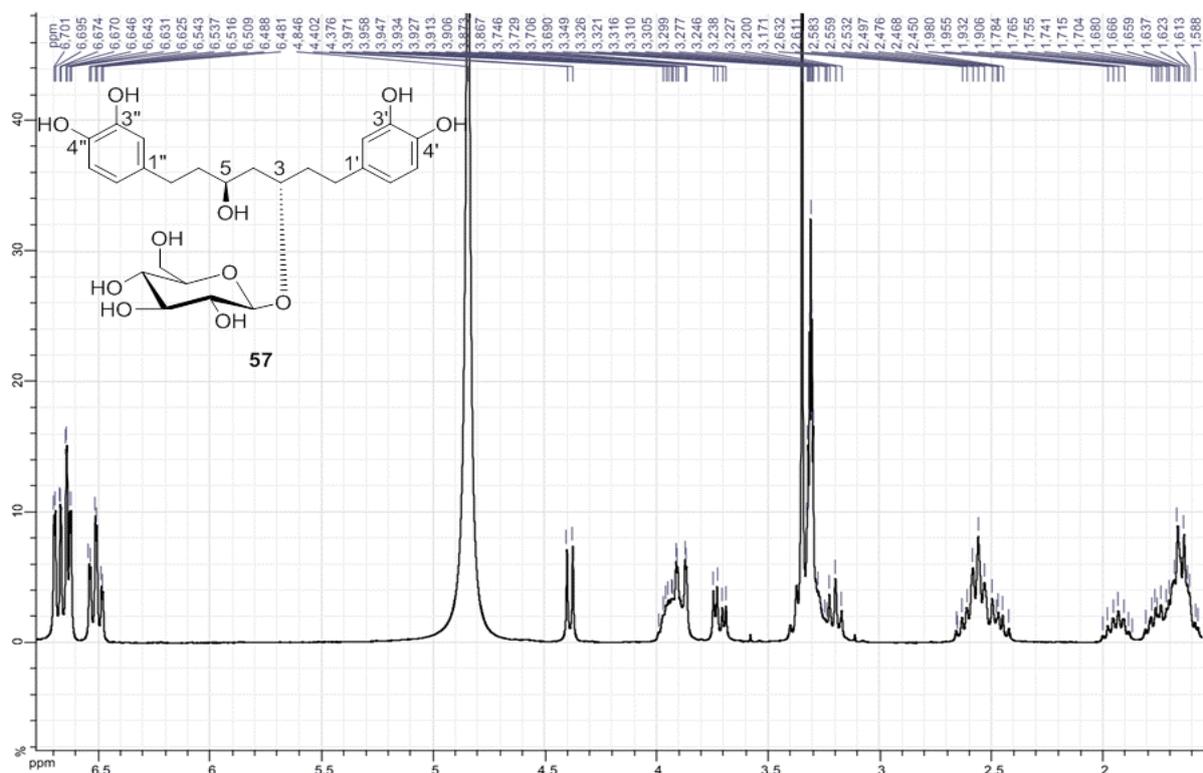
Spectre RMN ^1H du composé **56** à 300 MHz dans le CD_3OD .



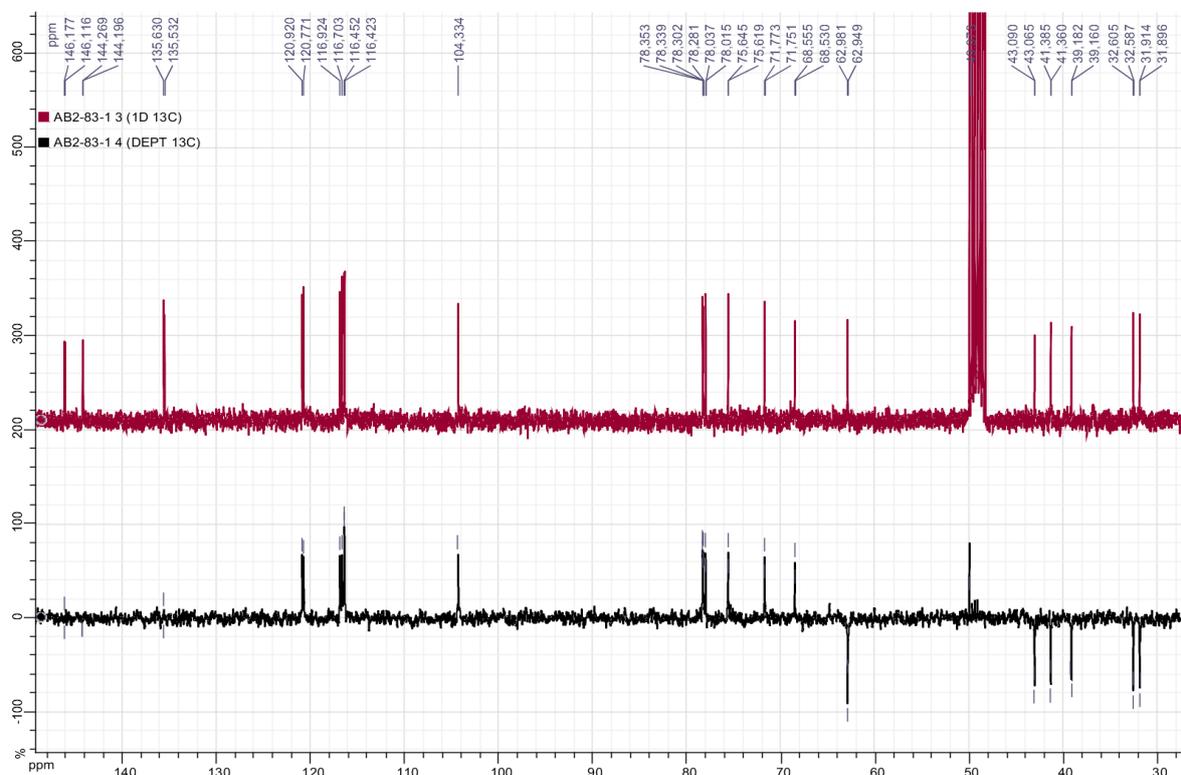
Spectres RMN ^{13}C et DEPT 135 du composé **56** à 75 MHz dans le CD_3OD .



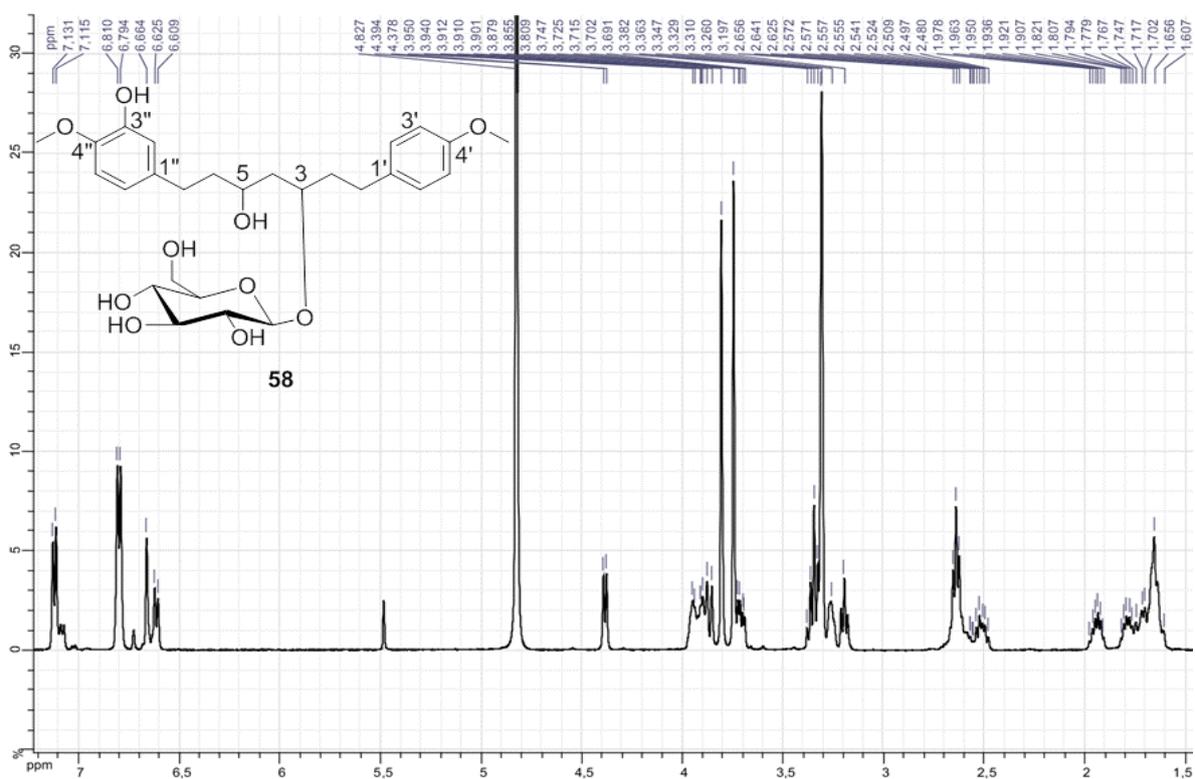
Spectre RMN ^1H du composé **57** à 300 MHz dans le CD_3OD .



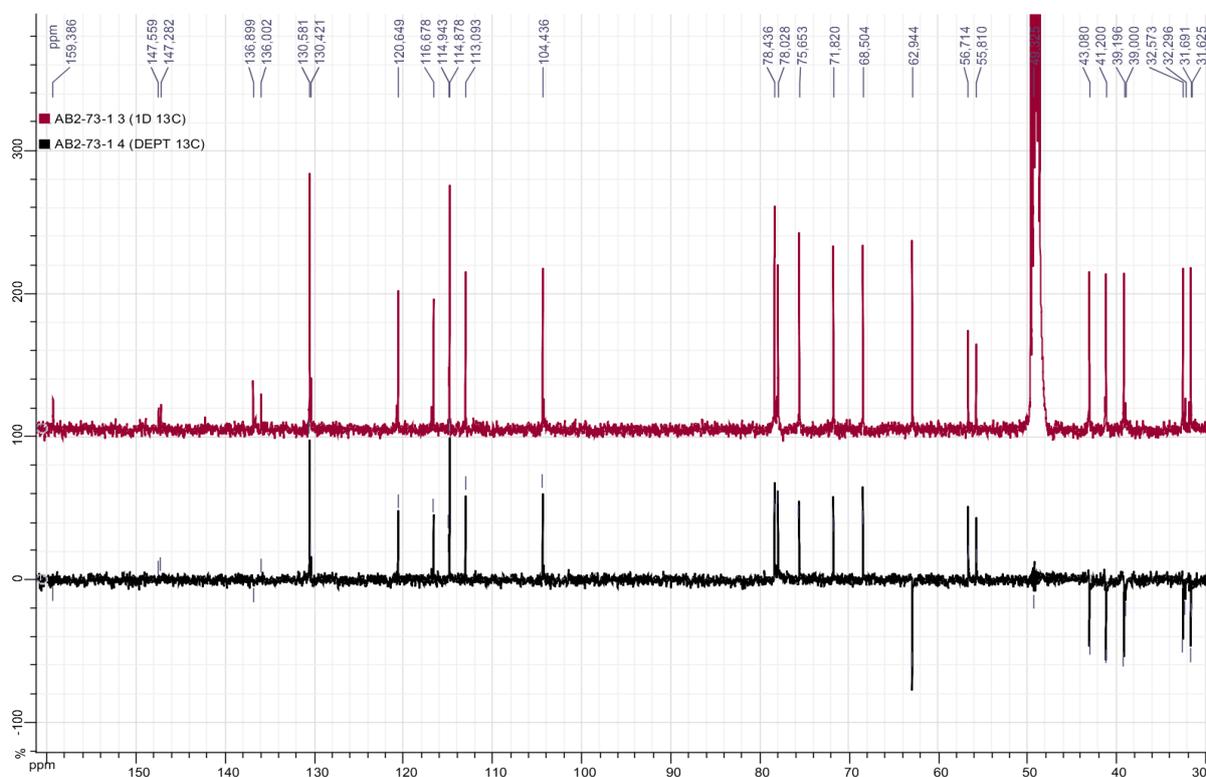
Spectres RMN ^{13}C et DEPT 135 du composé **57** à 75 MHz dans le CD_3OD .



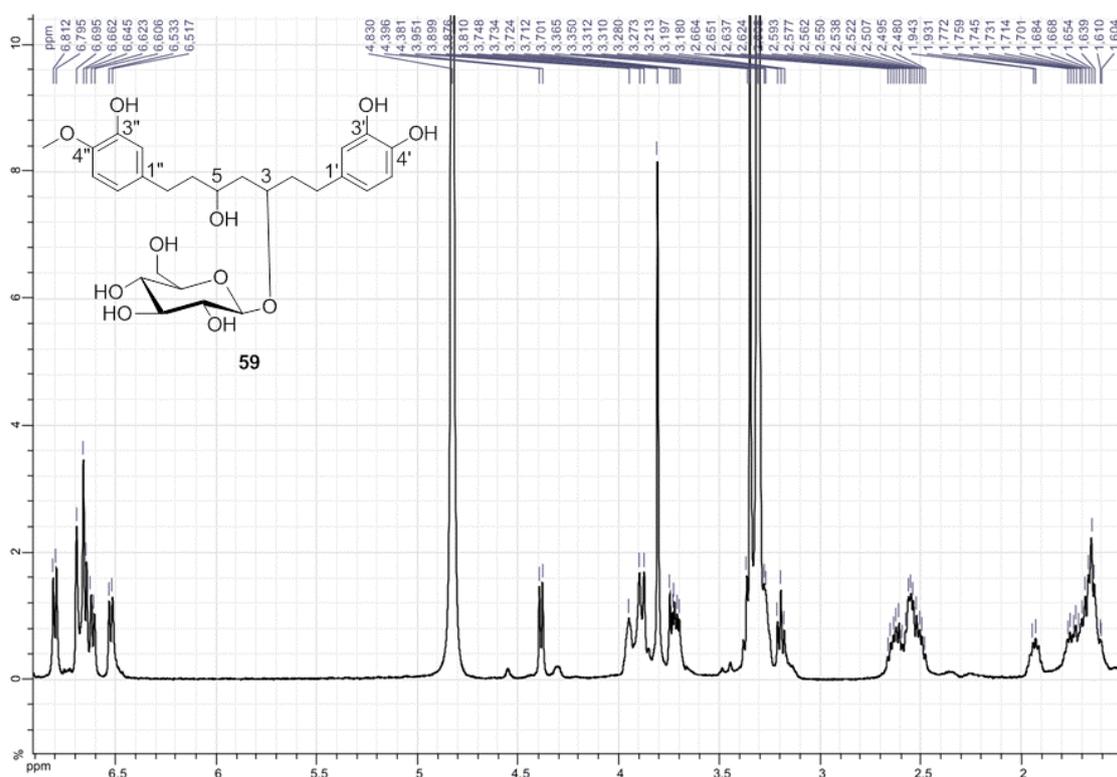
Spectre RMN ^1H du composé **58** à 500 MHz dans le CD_3OD .



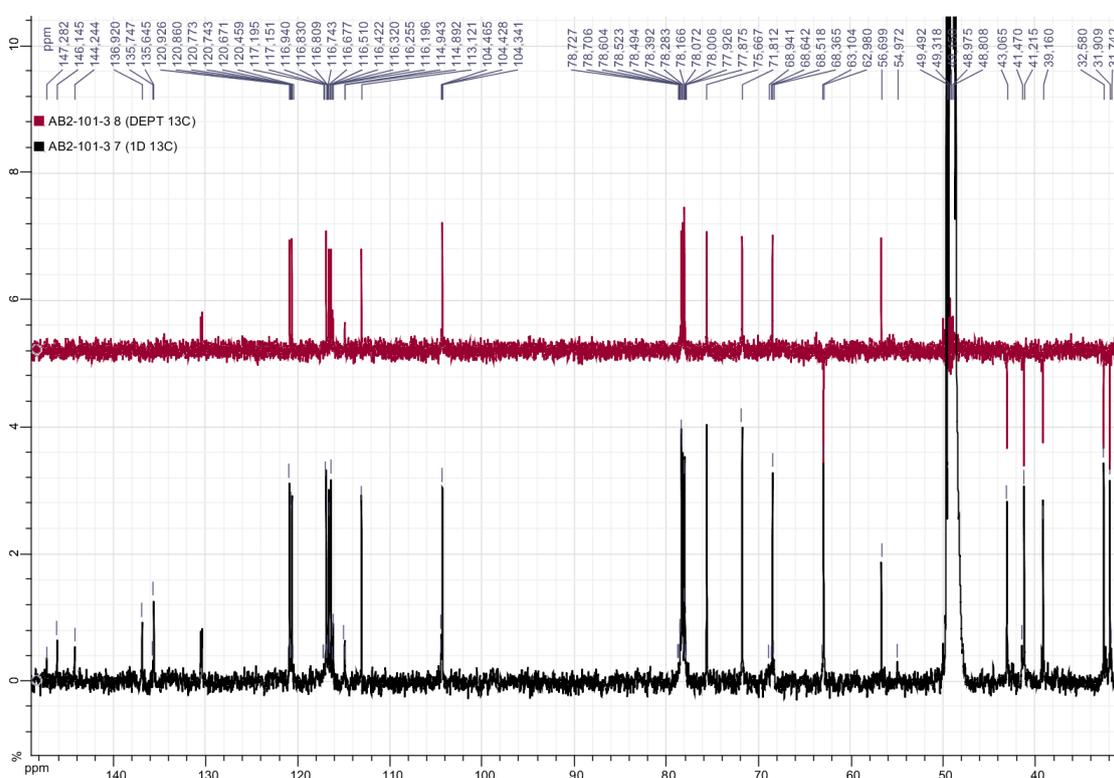
Spectres RMN ^{13}C et DEPT 135 du composé **58** à 125 MHz dans le CD_3OD .



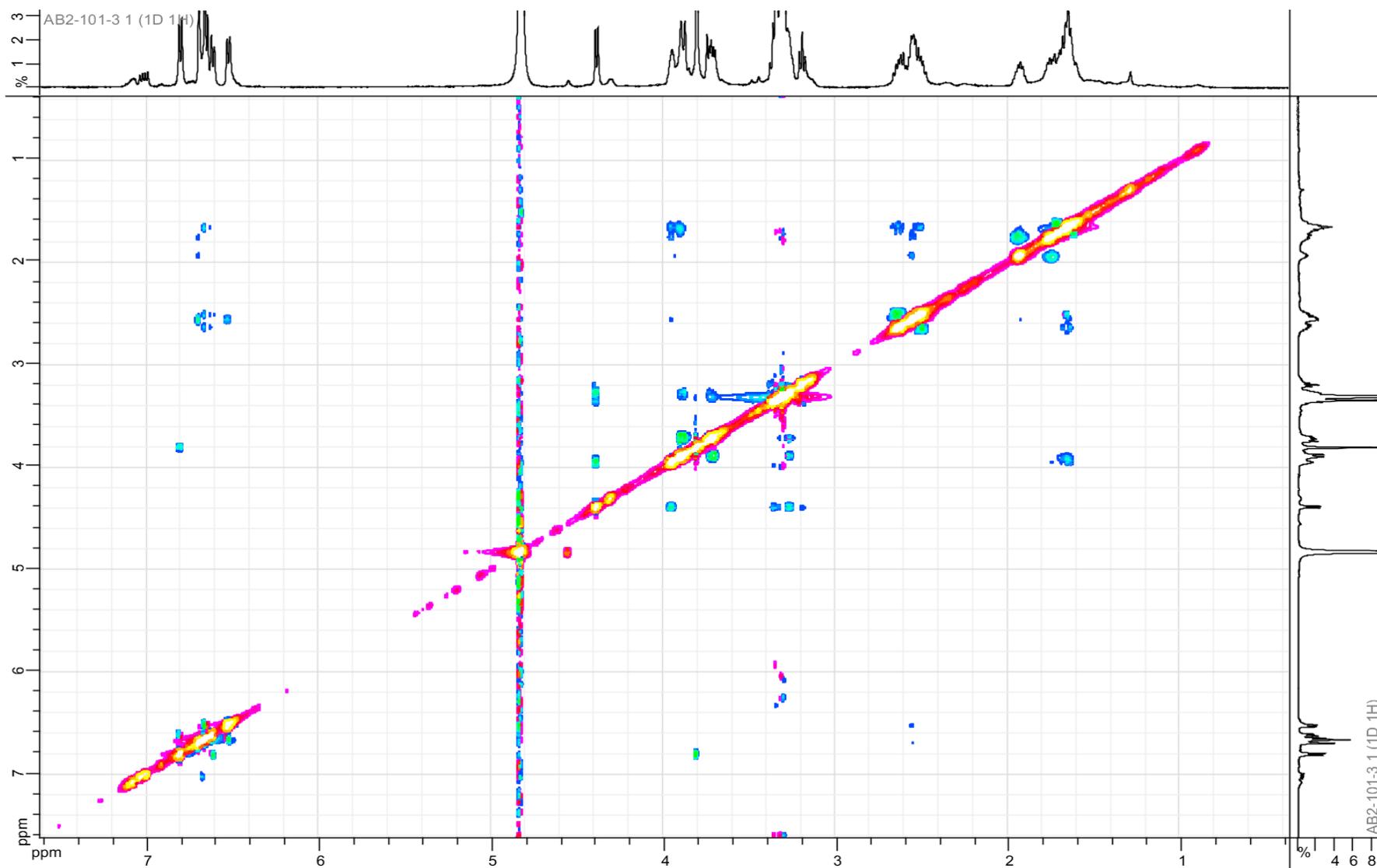
Spectre RMN ^1H du composé **59** à 500 MHz dans le CD_3OD .



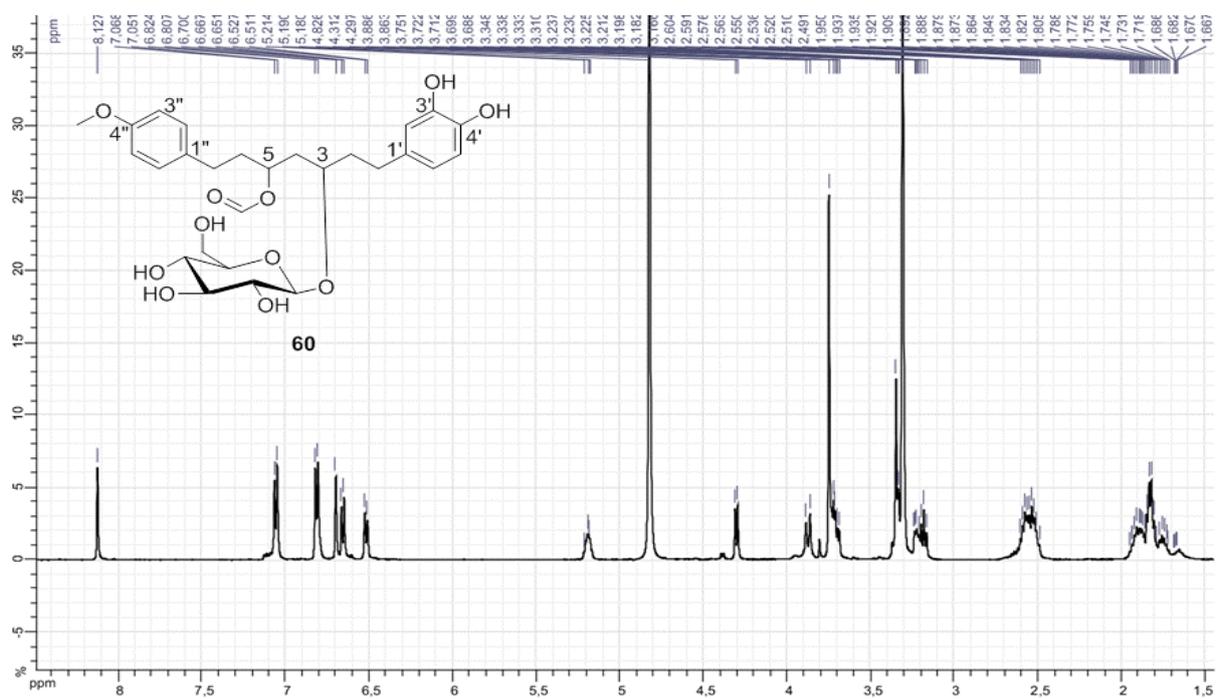
Spectres RMN ^{13}C et DEPT 135 du composé **59** à 125 MHz dans le CD_3OD .



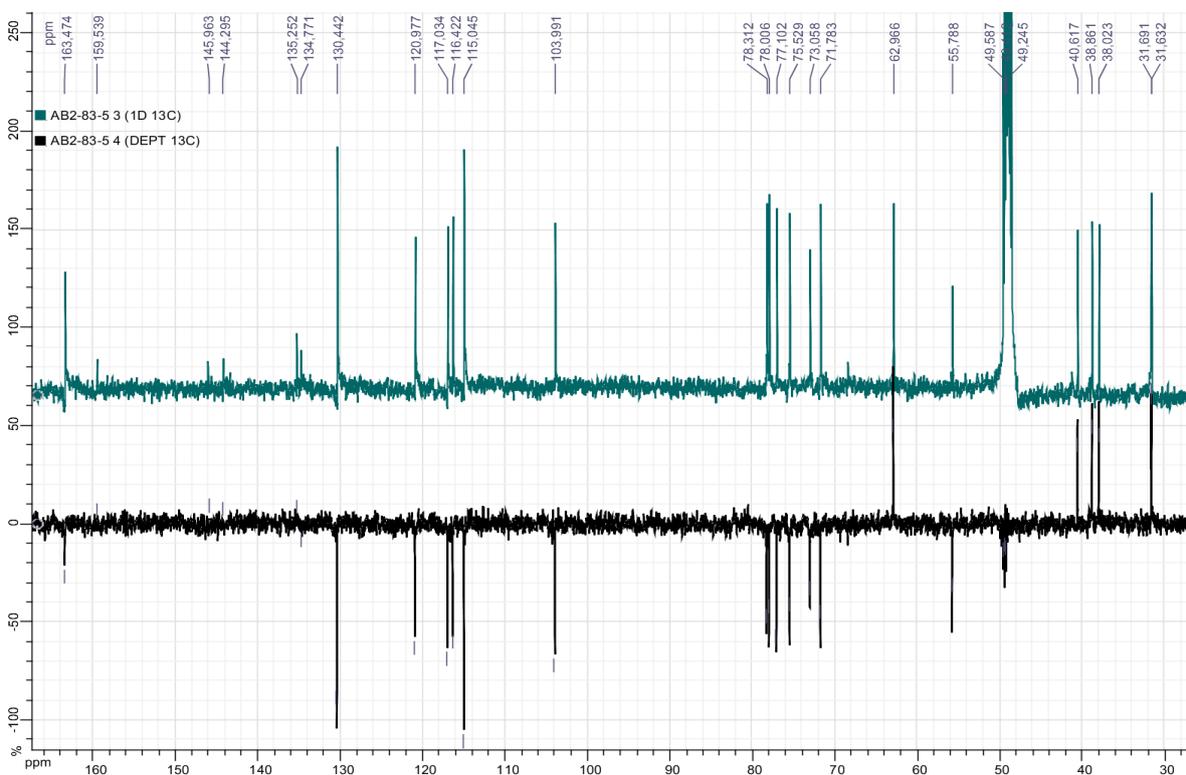
Spectre NOESY du composé **59** à 500 MHz dans le CD₃OD.



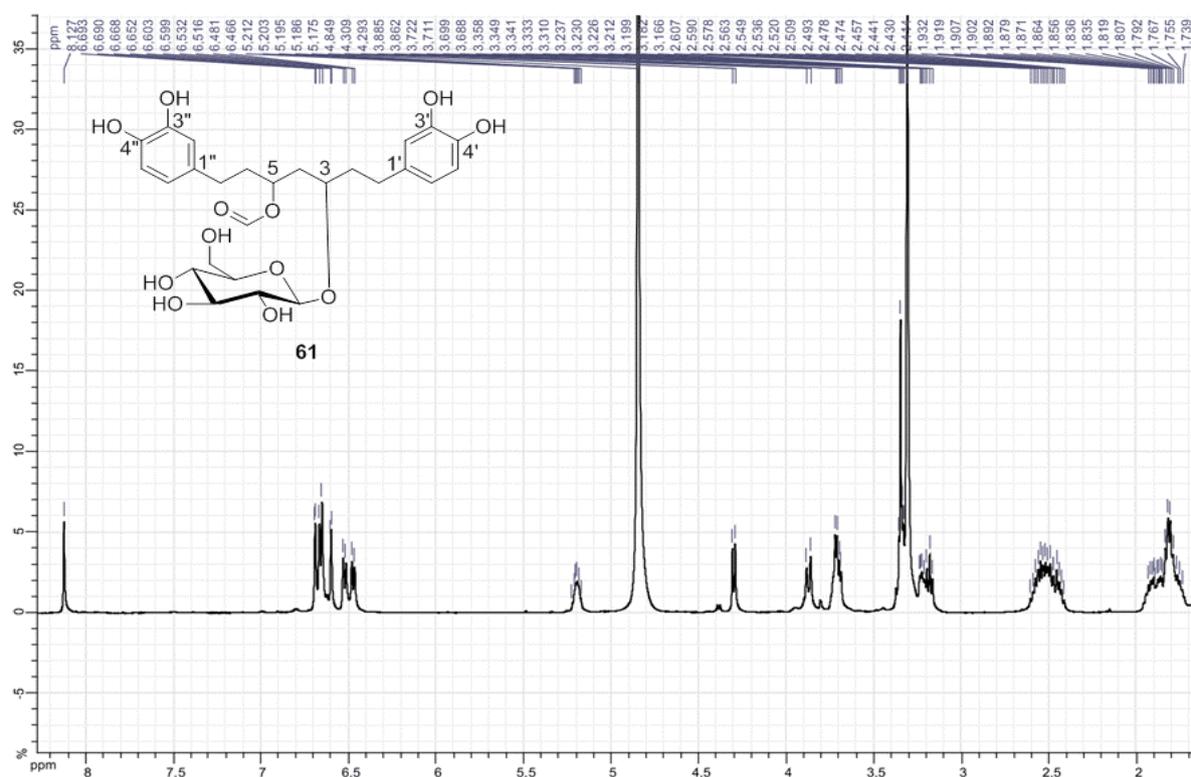
Spectre RMN ^1H du composé **60** à 500 MHz dans le CD_3OD .



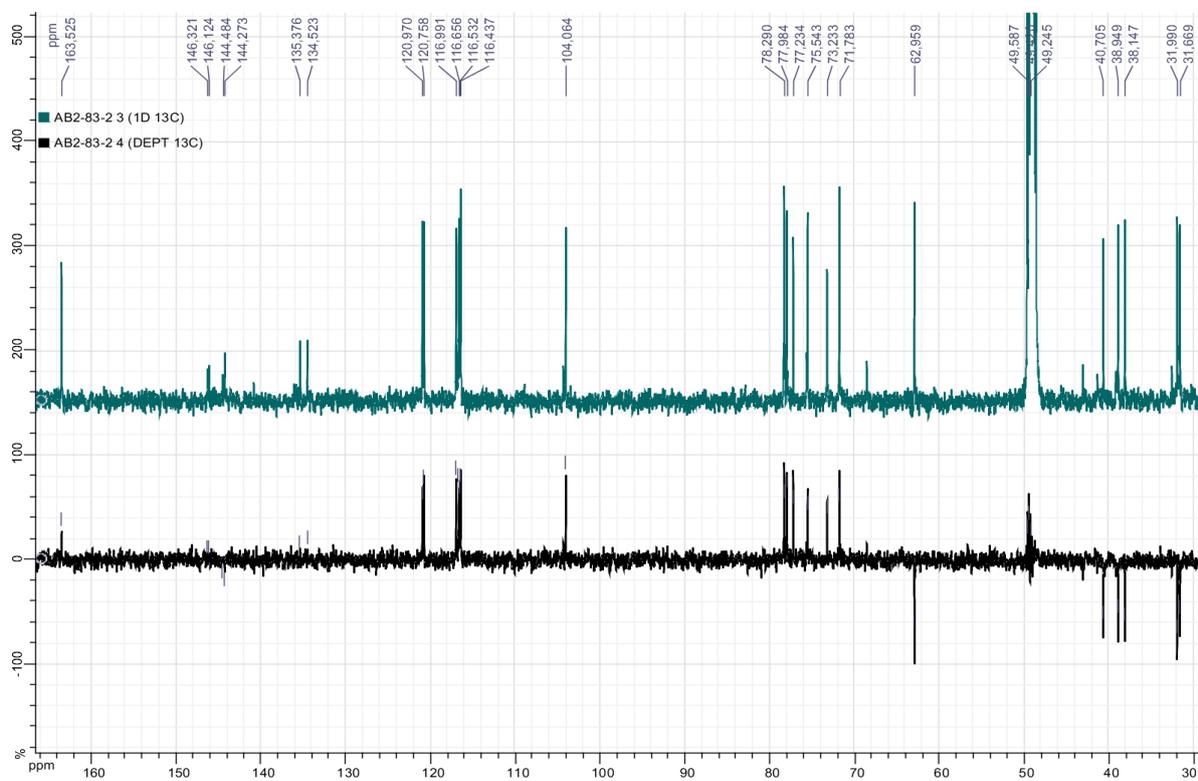
Spectres RMN ^{13}C et DEPT 135 du composé **60** à 125 MHz dans le CD_3OD .



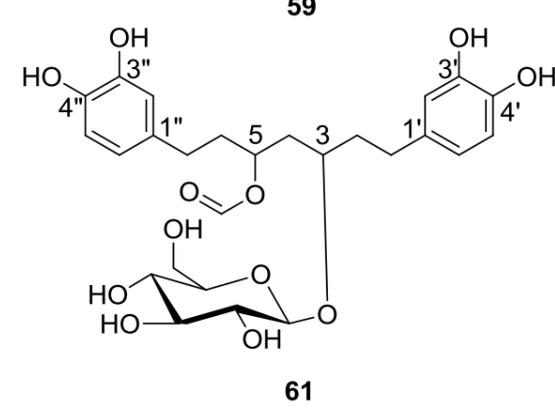
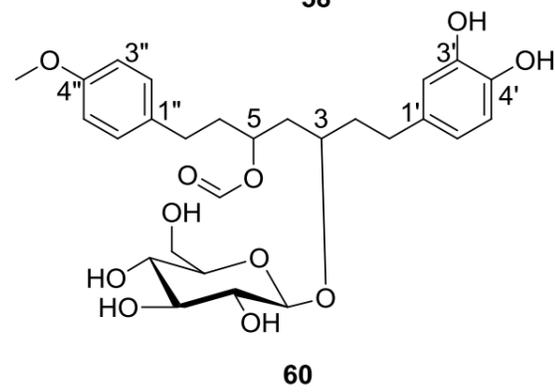
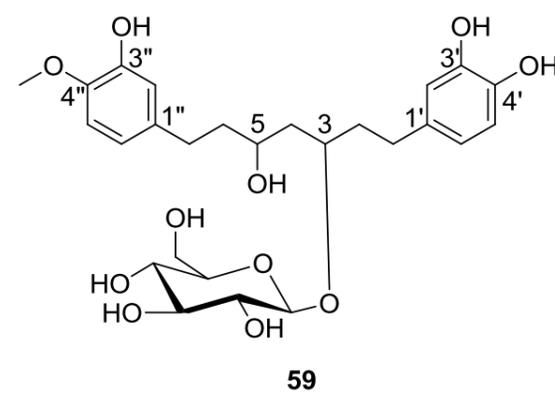
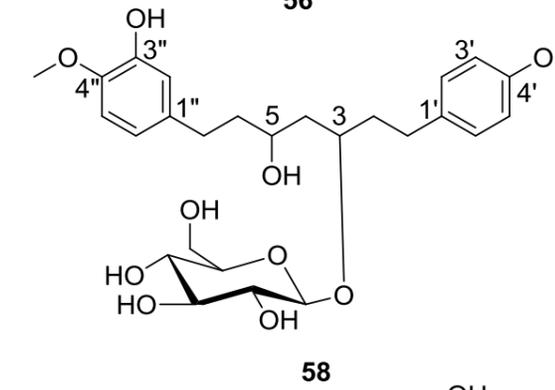
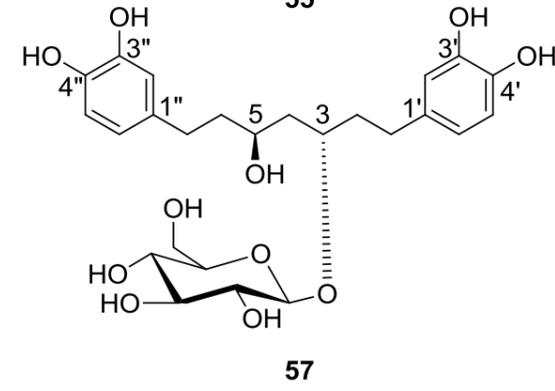
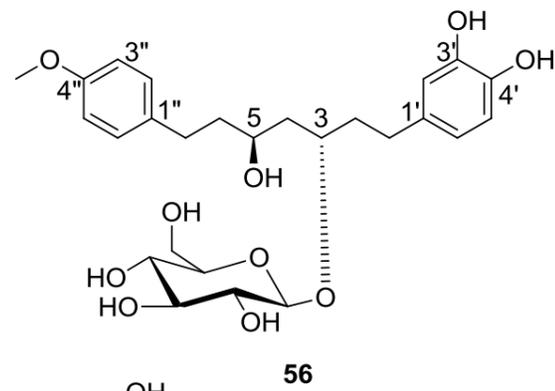
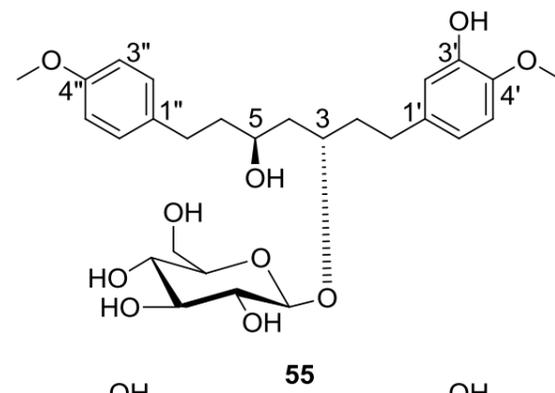
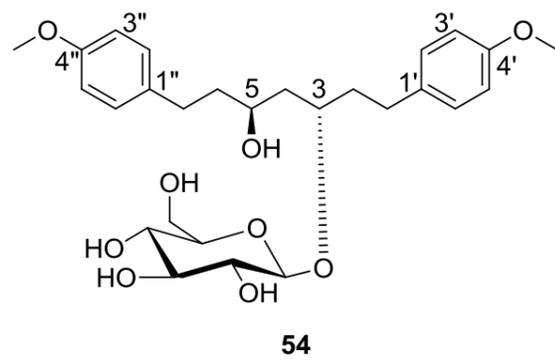
Spectre RMN ^1H du composé **61** à 500 MHz dans le CD_3OD .



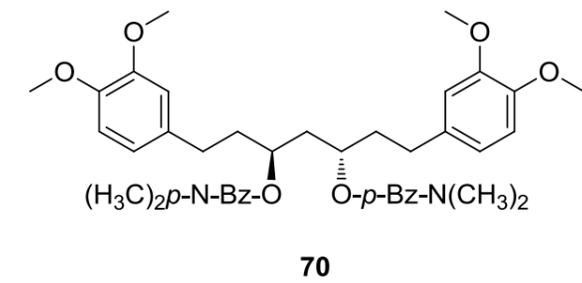
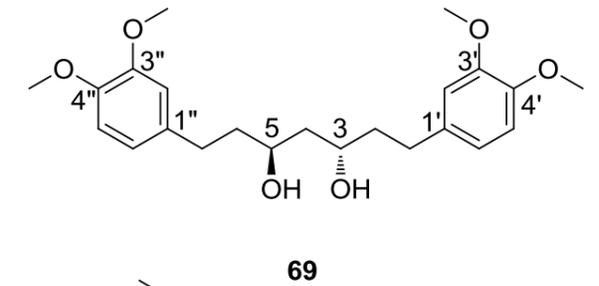
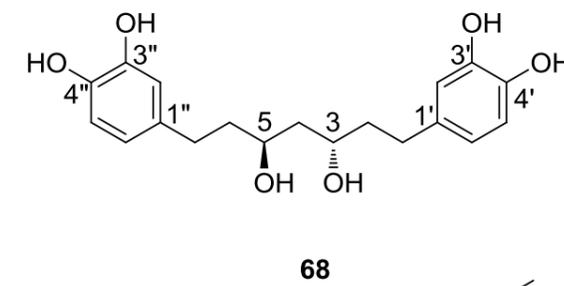
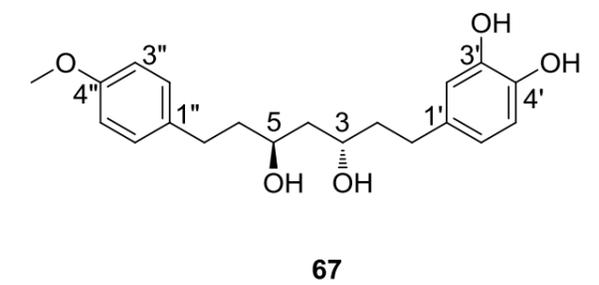
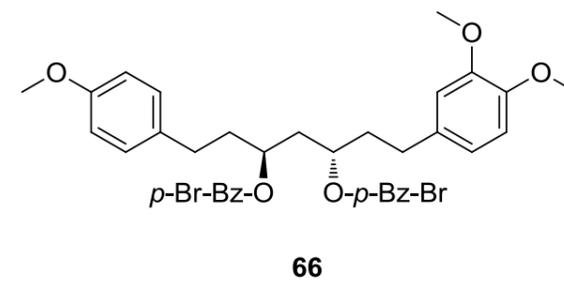
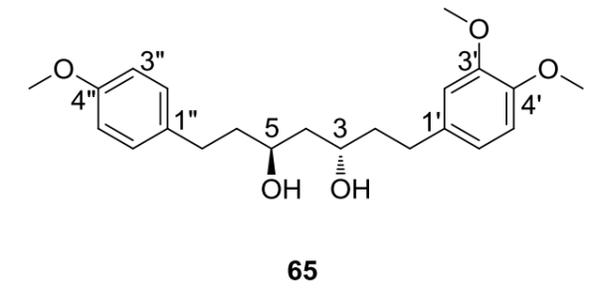
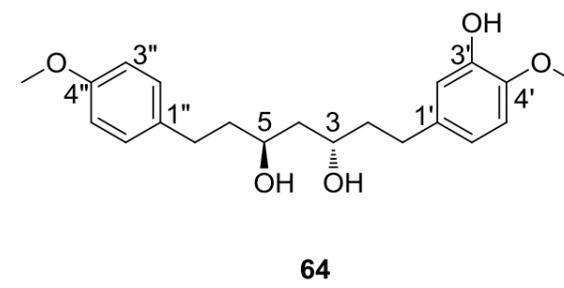
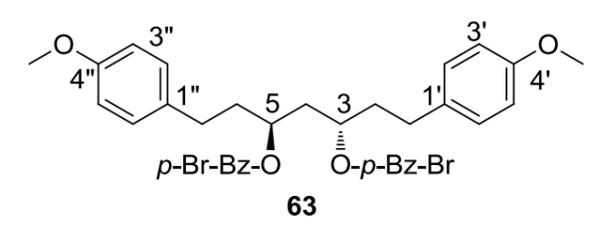
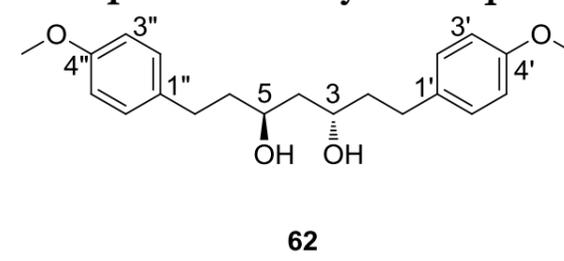
Spectres RMN ^{13}C et DEPT 135 du composé **61** à 125 MHz dans le CD_3OD .



Composés naturels (54-61) :



Composés hémisynthétiques (62-70) :



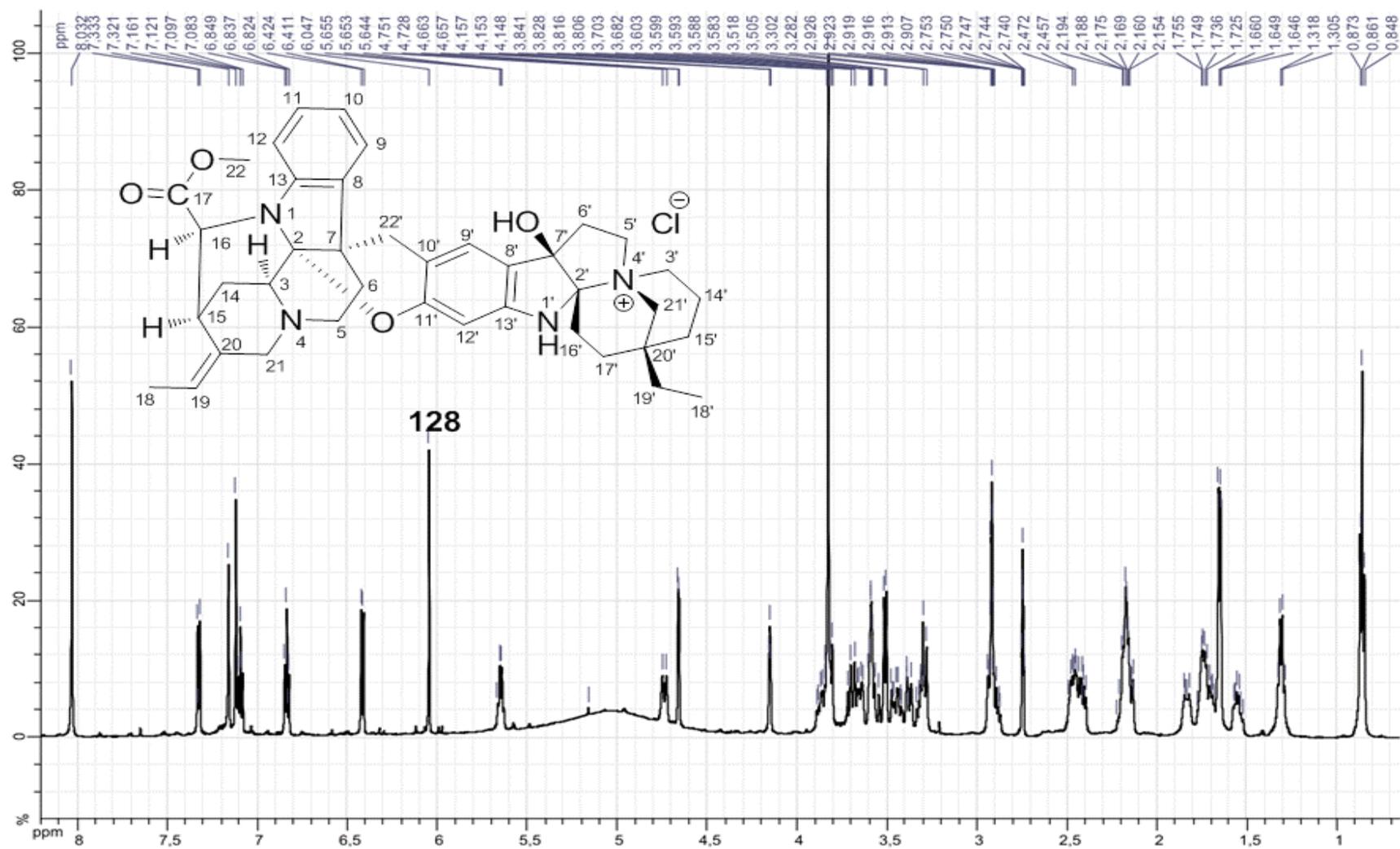
**Annexe 4 : Composés isolés des feuilles de *Pyrostria major* (54-61)
et composés hémisynthétiques (62-70)**



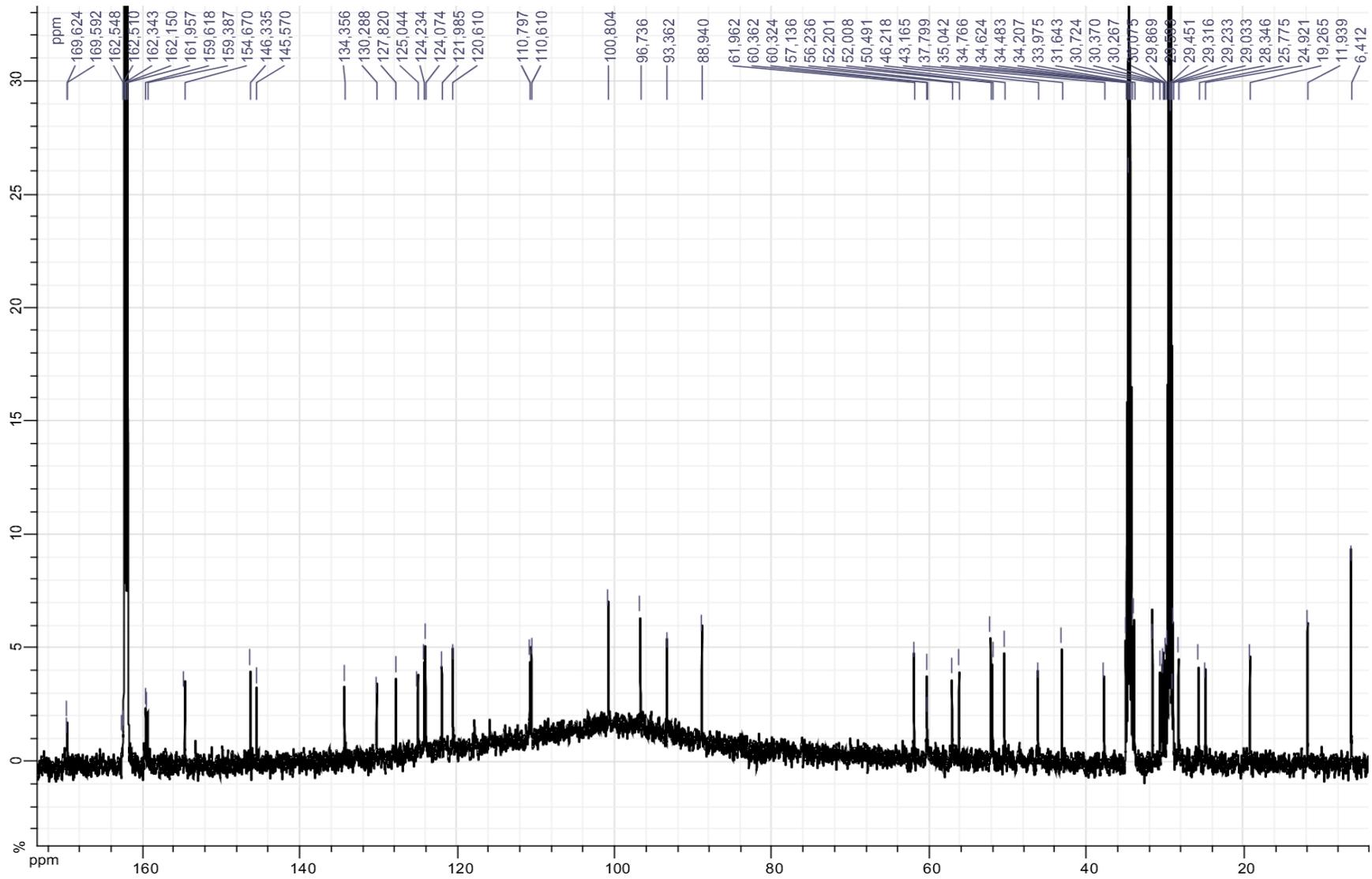
Soulevez la page S.V.P.

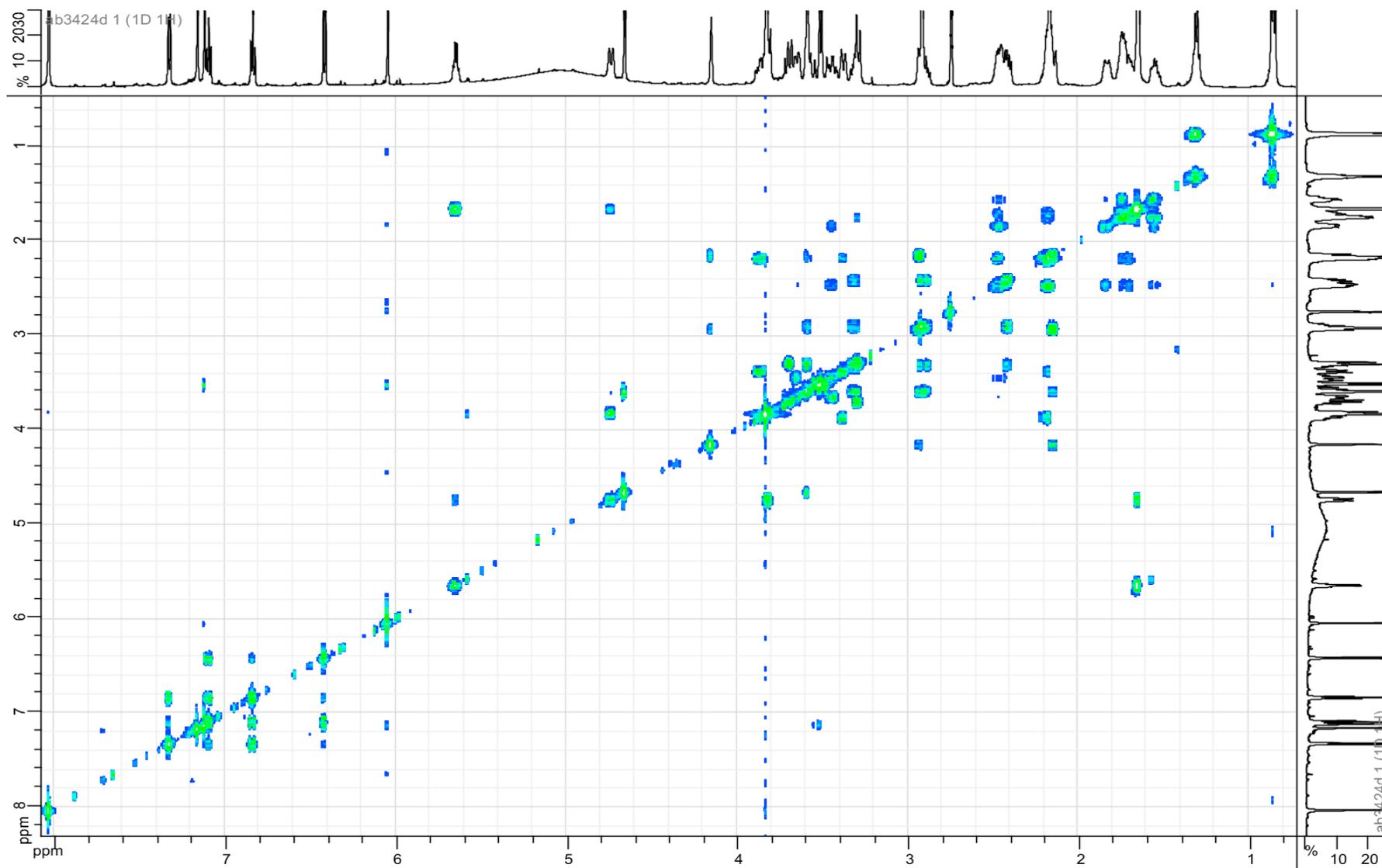
Annexe 5 : Spectres RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC et ROESY) de la goniomedine A

Spectre RMN ^1H de la goniomedine A (**128**) à 600 MHz dans le DMF- d_7 .

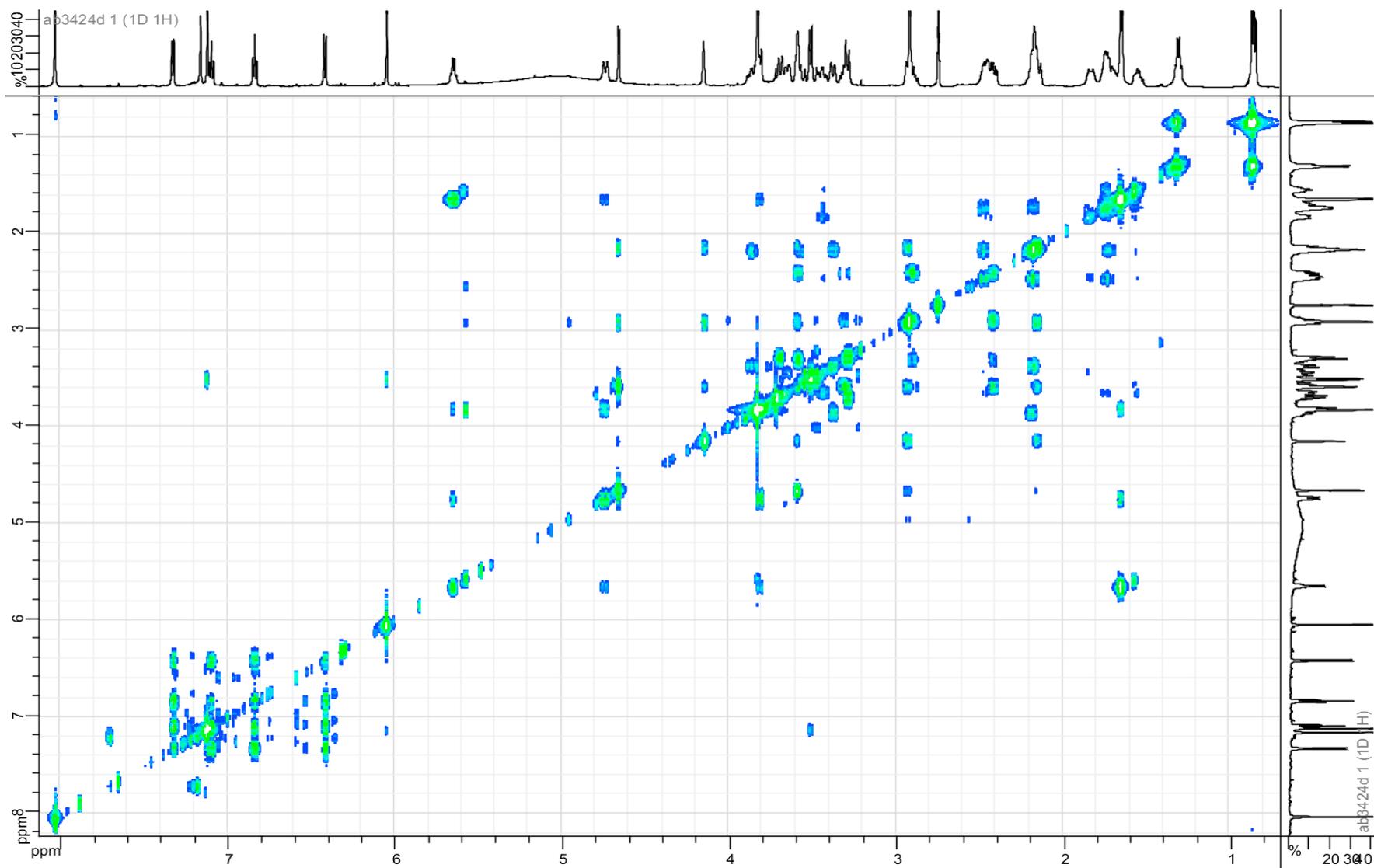


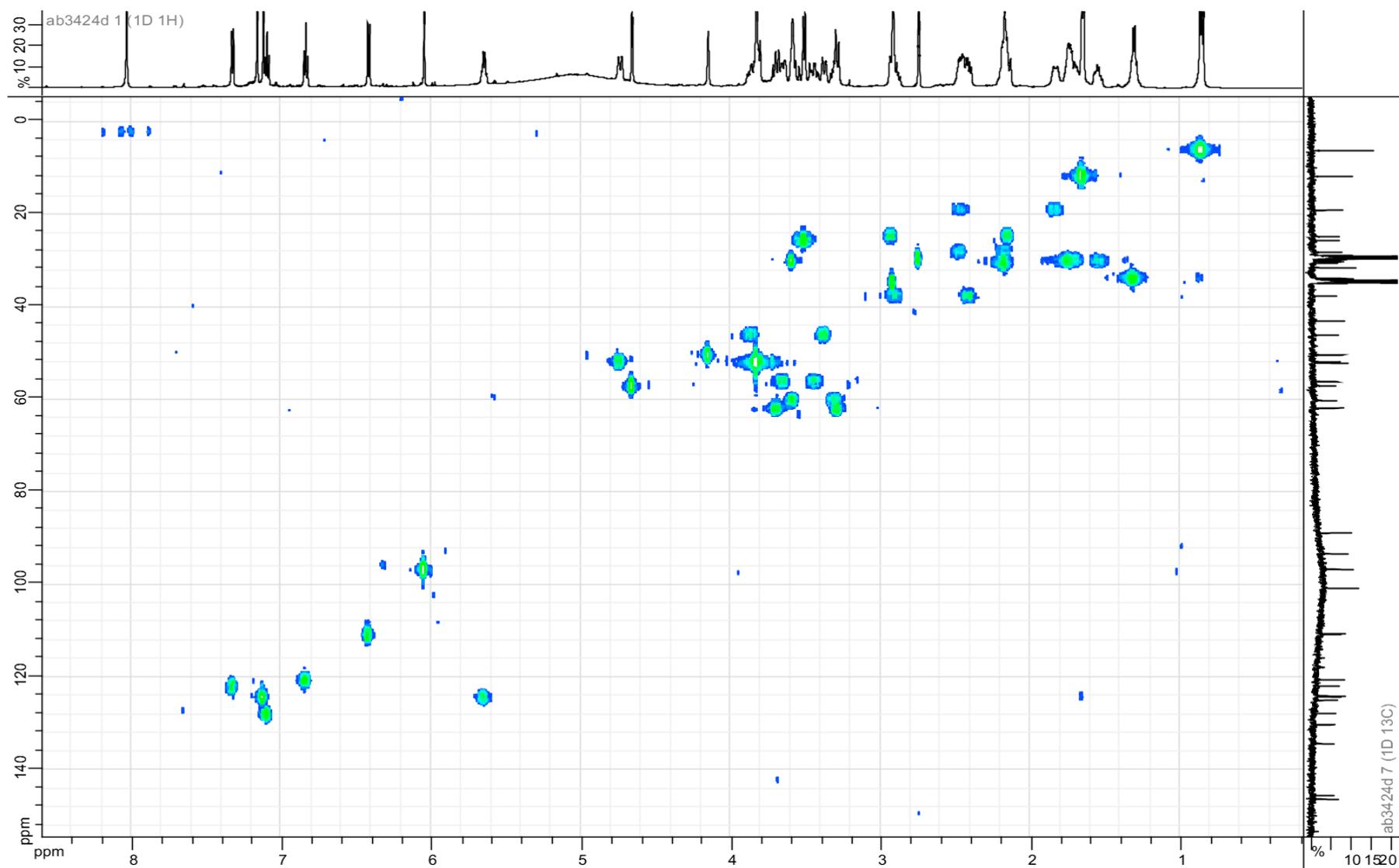
Spectre RMN ^{13}C de la goniomedine A (**128**) à 150 MHz dans le DMF- d_7 .

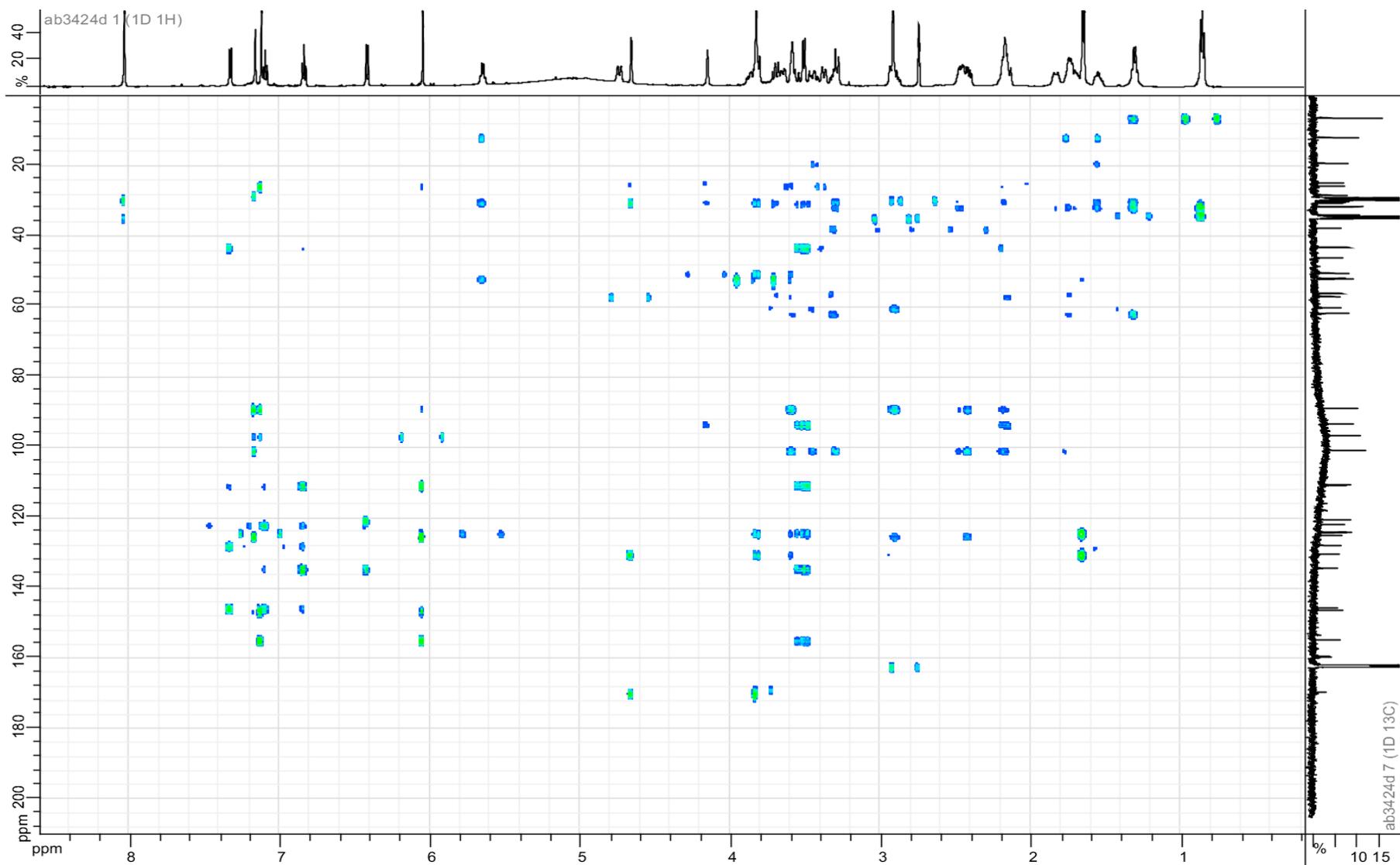


Spectre RMN COSY de la goniomedine A (**128**) à 600 MHz dans le DMF- d_7 .

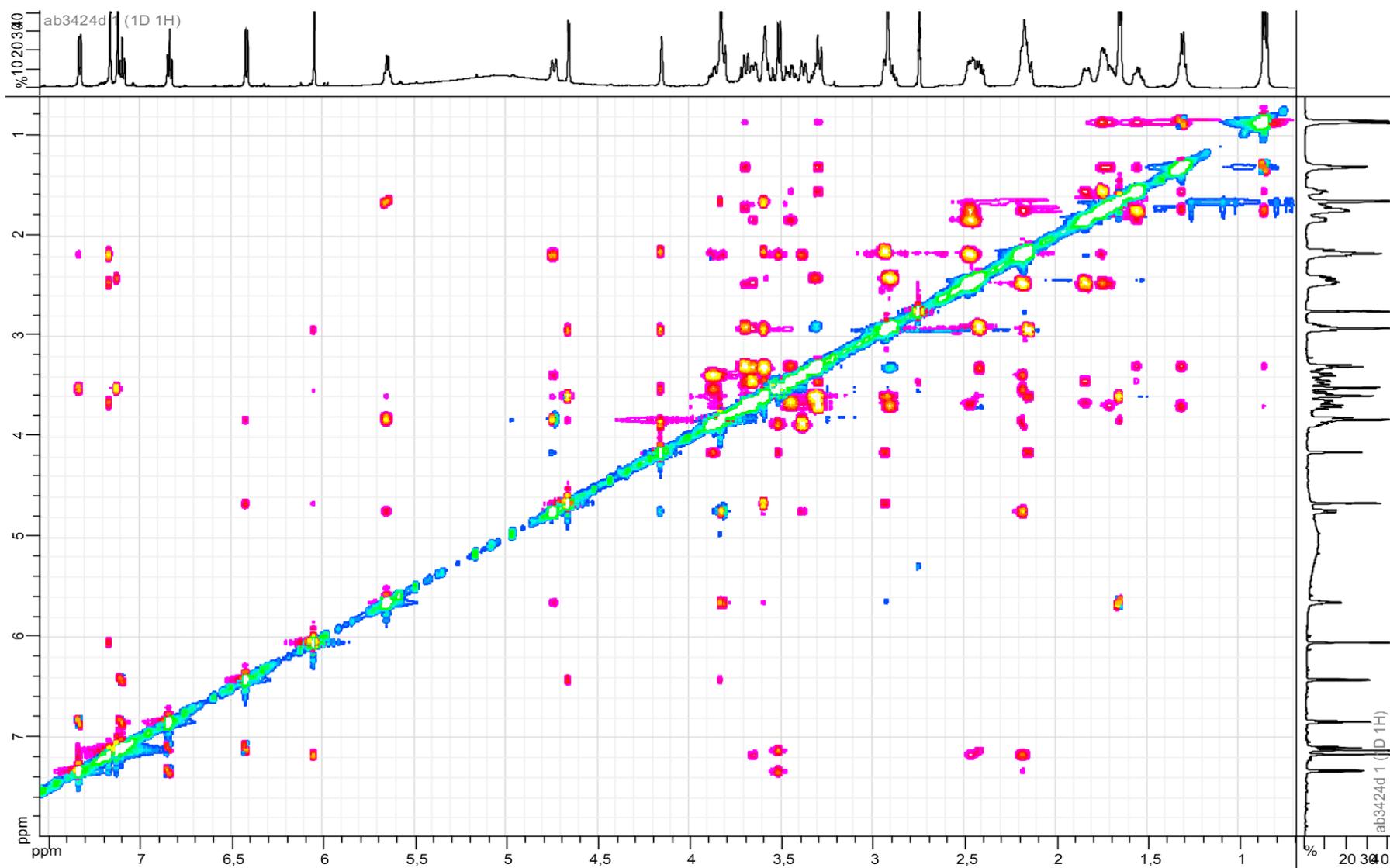
Spectre RMN TOCSY de la goniomedine A (**128**) à 600 MHz dans le DMF- d_7 .



Spectre RMN HSQC de la goniomedine A (**128**) à 600 MHz dans le DMF- d_7 .

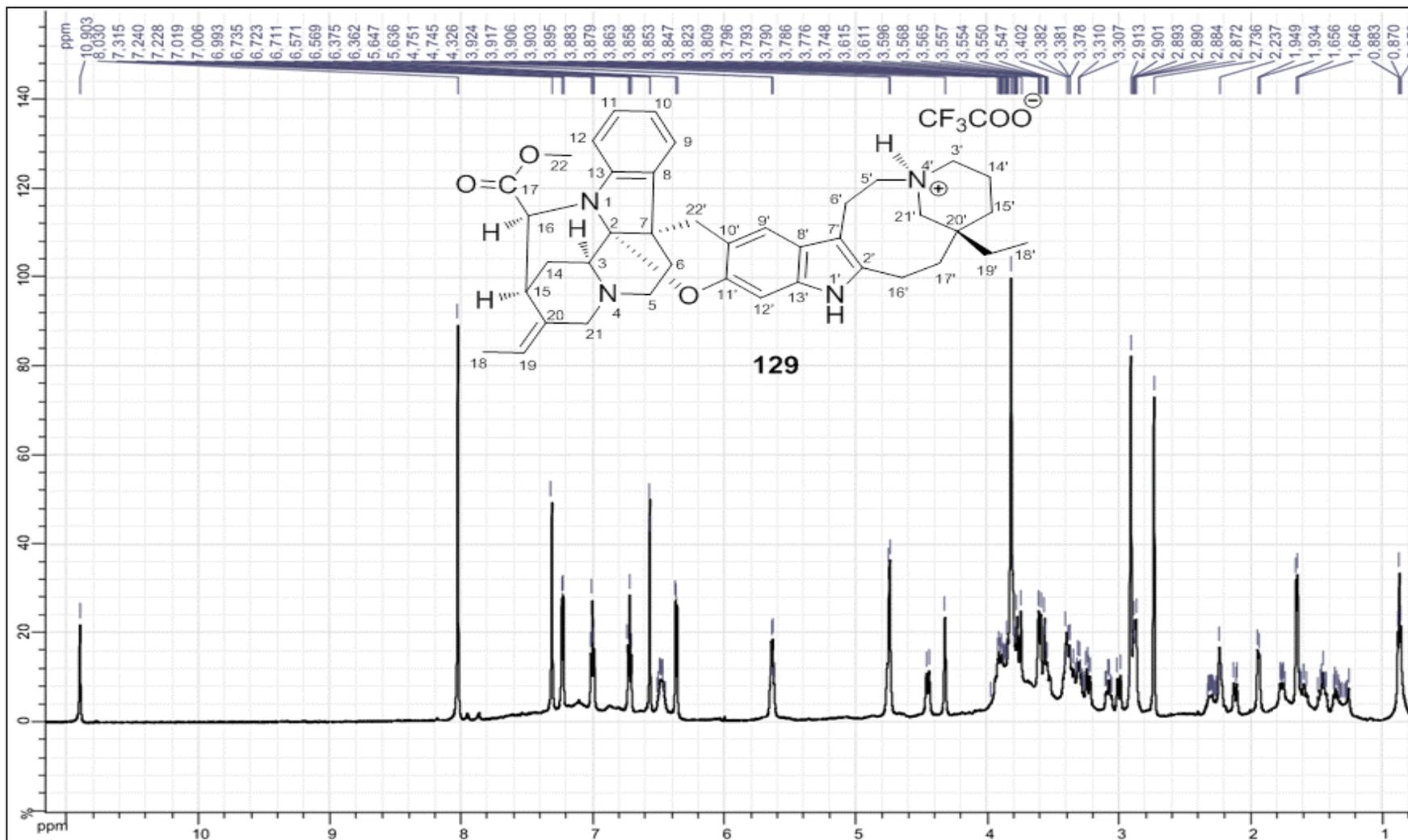
Spectre RMN HMBC de la goniomedine A (**128**) à 600 MHz dans le DMF-*d*₇.

Spectre RMN ROESY de la goniomedine A (**128**) à 600 MHz dans le DMF- d_7 .

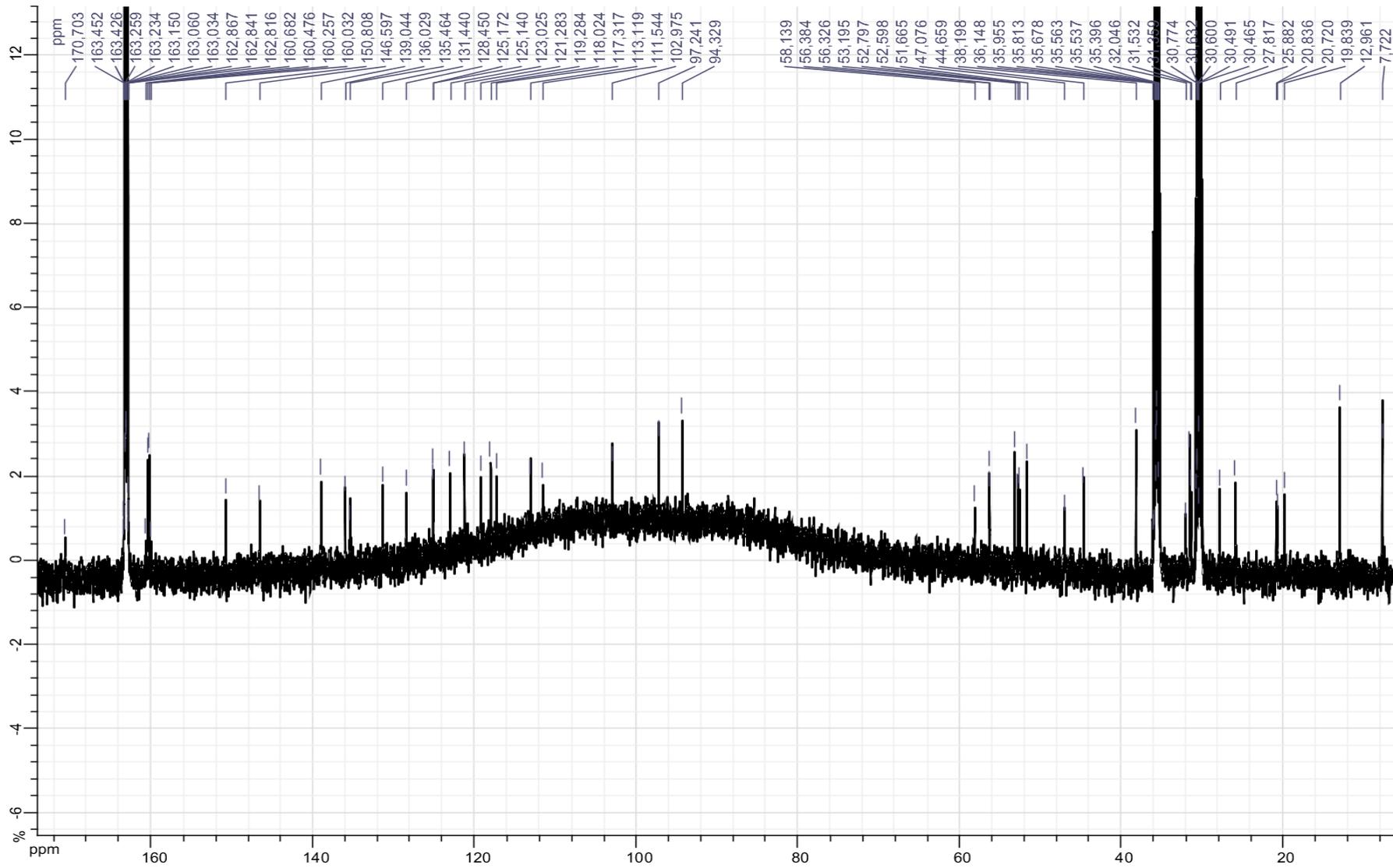


Annexe 6 : Spectres RMN 1D (^1H , ^{13}C) et 2D (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC et ROESY) de la goniomedine B

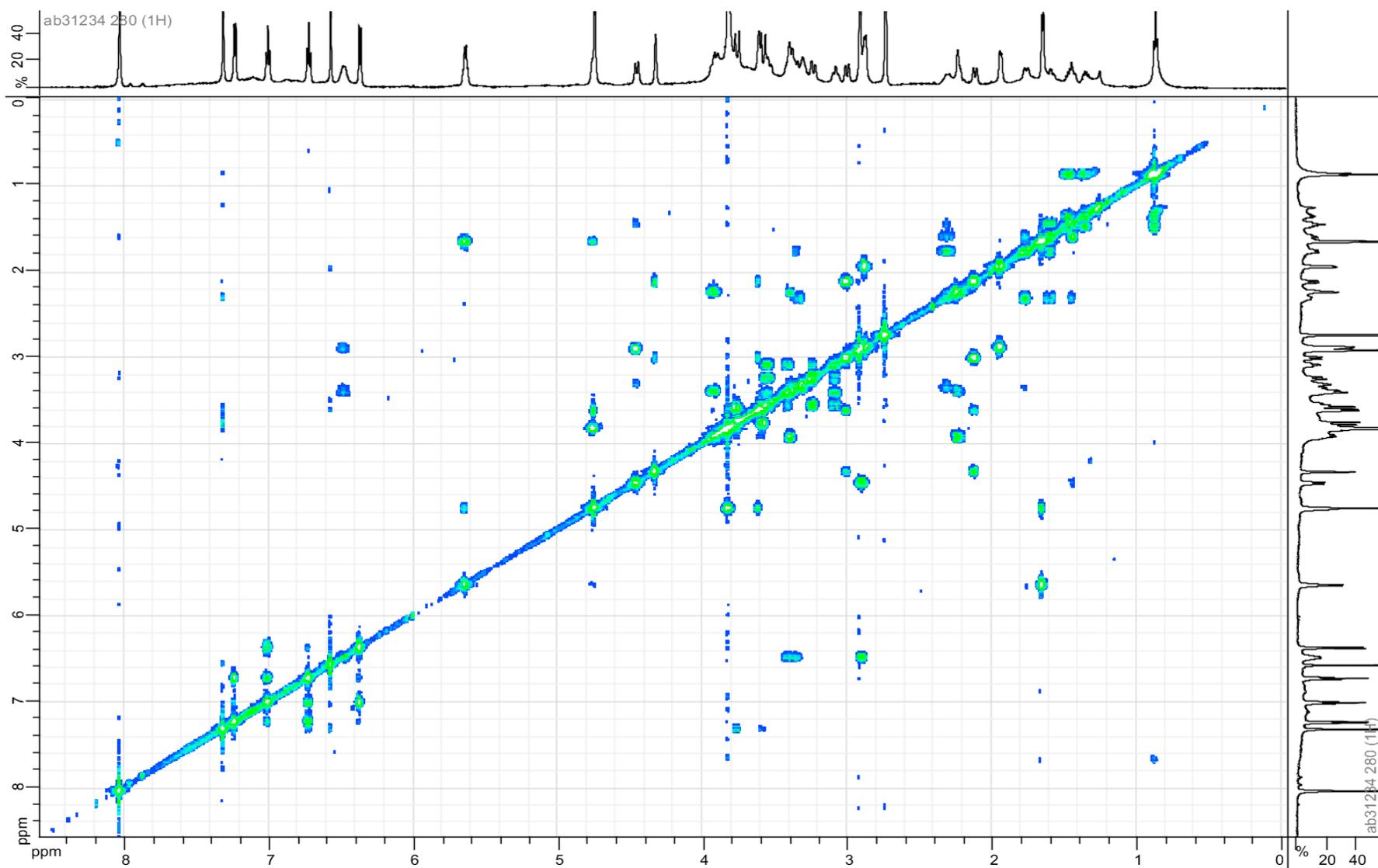
Spectre RMN ^1H de la goniomedine B (**129**) à 600 MHz dans le $\text{DMF-}d_7$.



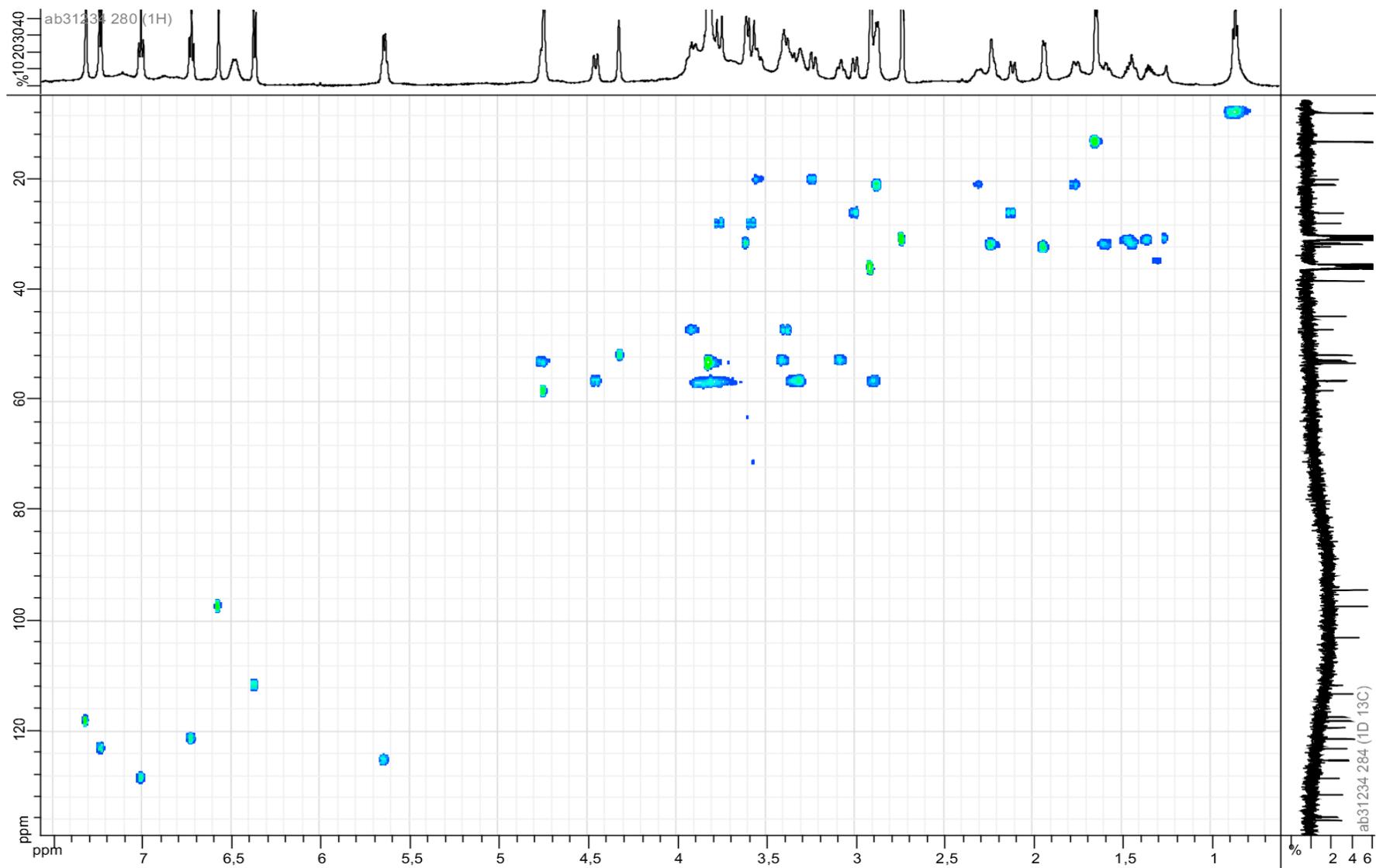
Spectre RMN ^{13}C de la goniomedine B (**129**) à 150 MHz dans le DMF- d_7 .

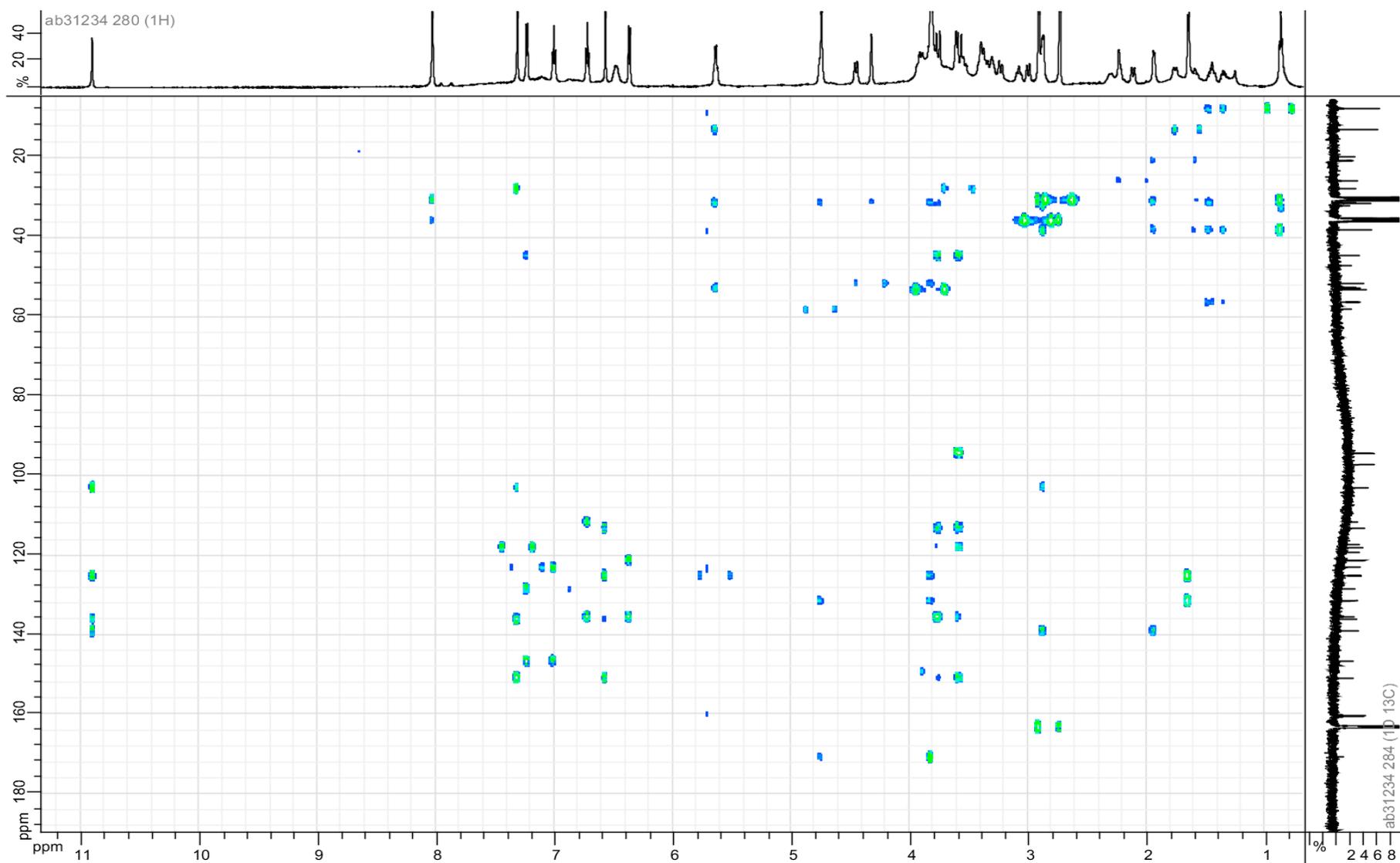


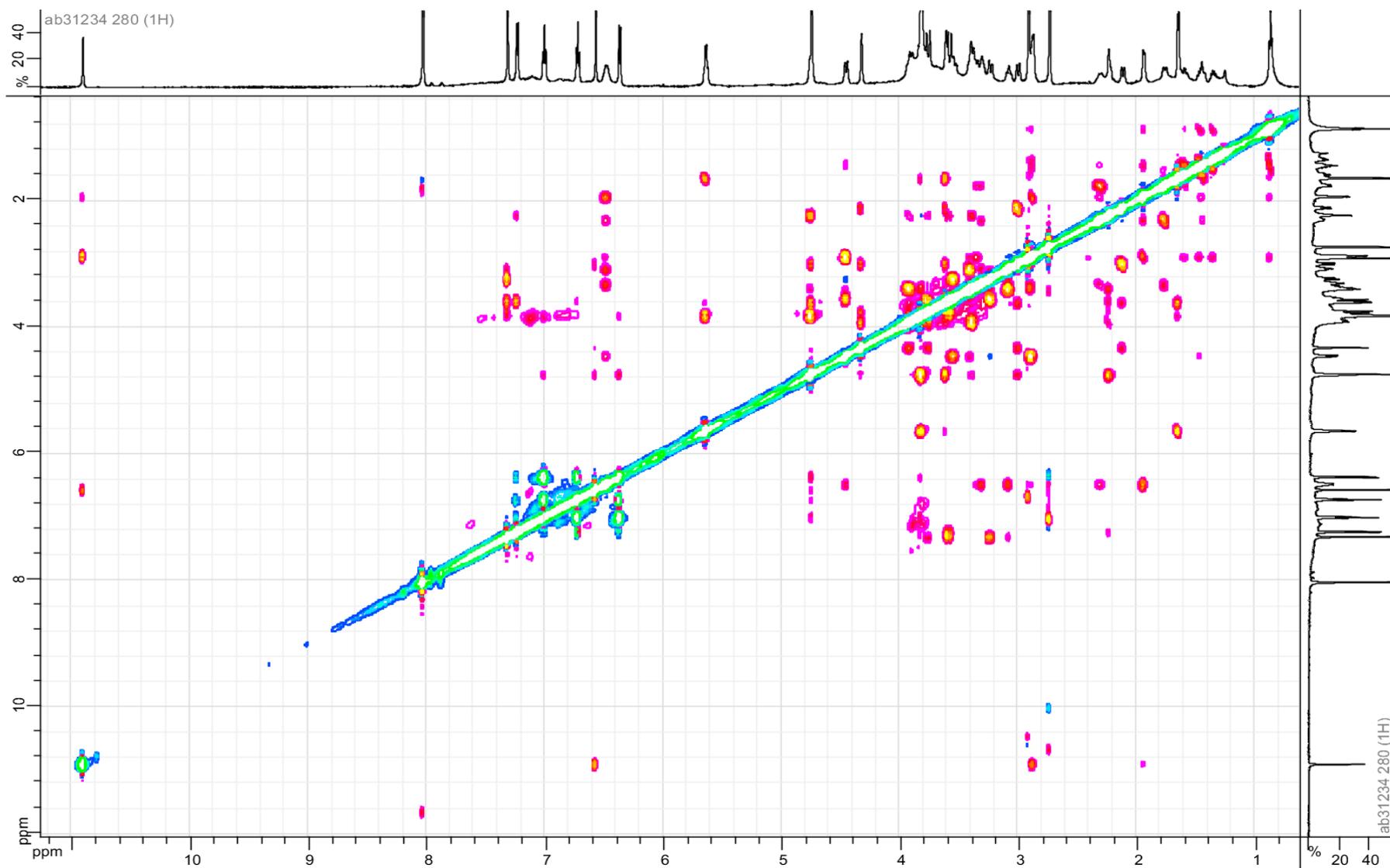
Spectre RMN COSY de la goniomedine B (**129**) à 600 MHz dans le DMF- d_7 .



Spectre RMN HSQC de la goniomedine B (**129**) à 600 MHz dans le DMF- d_7 .

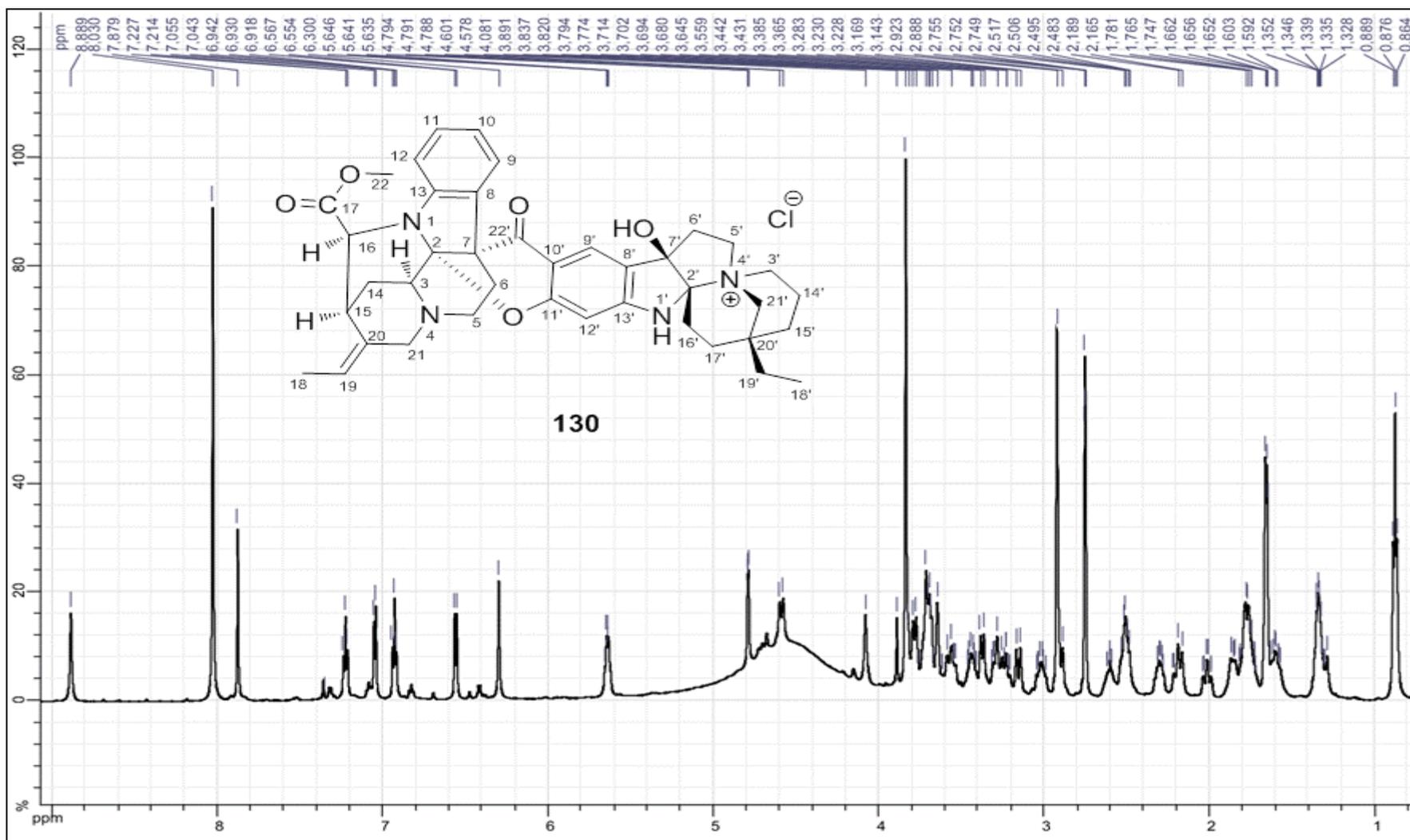


Spectre RMN HMBC de la goniomedine B (**129**) à 600 MHz dans le DMF-*d*₇.

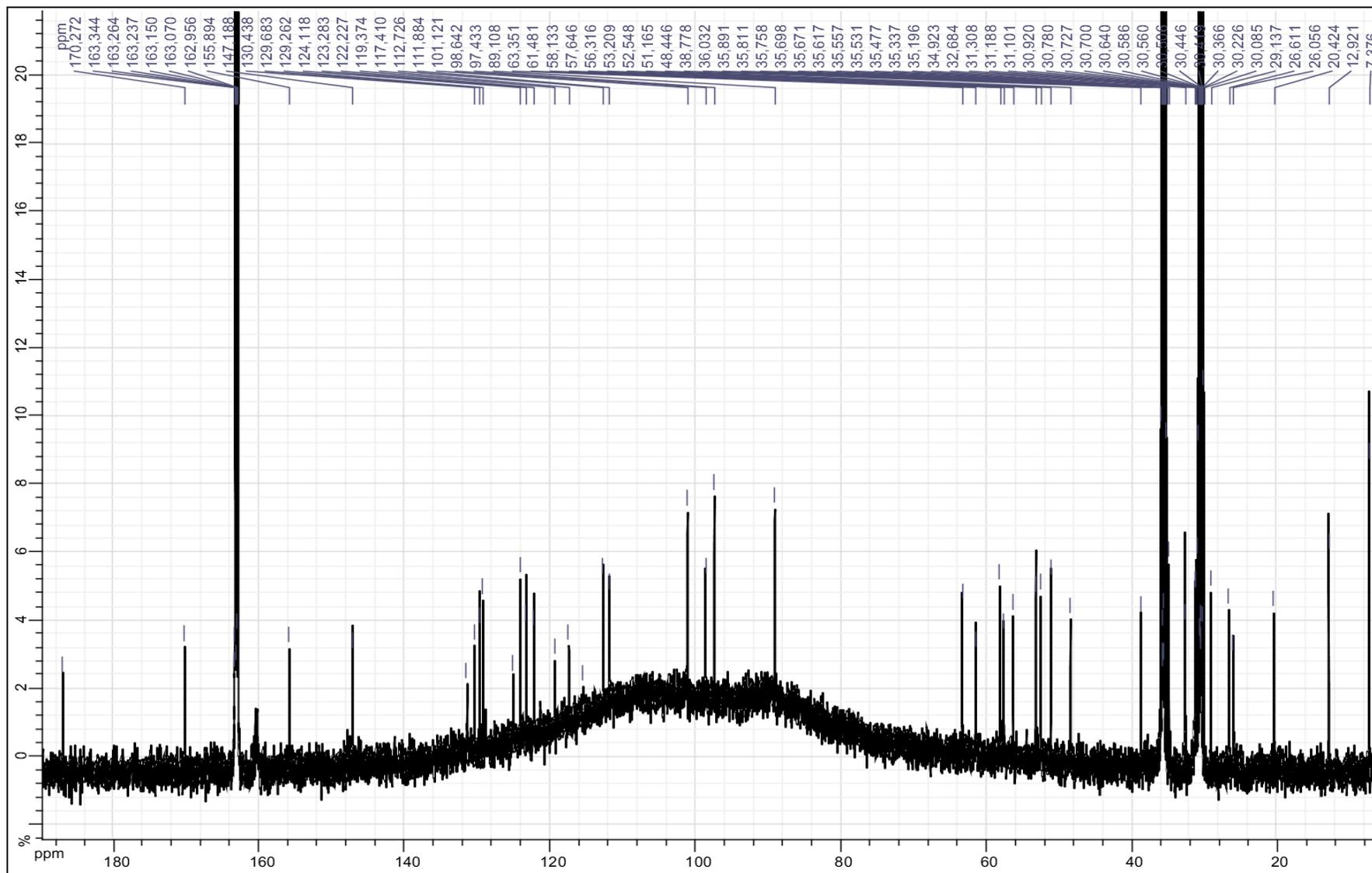
Spectre RMN ROESY de la goniomedine B (**129**) à 600 MHz dans le DMF- d_7 .

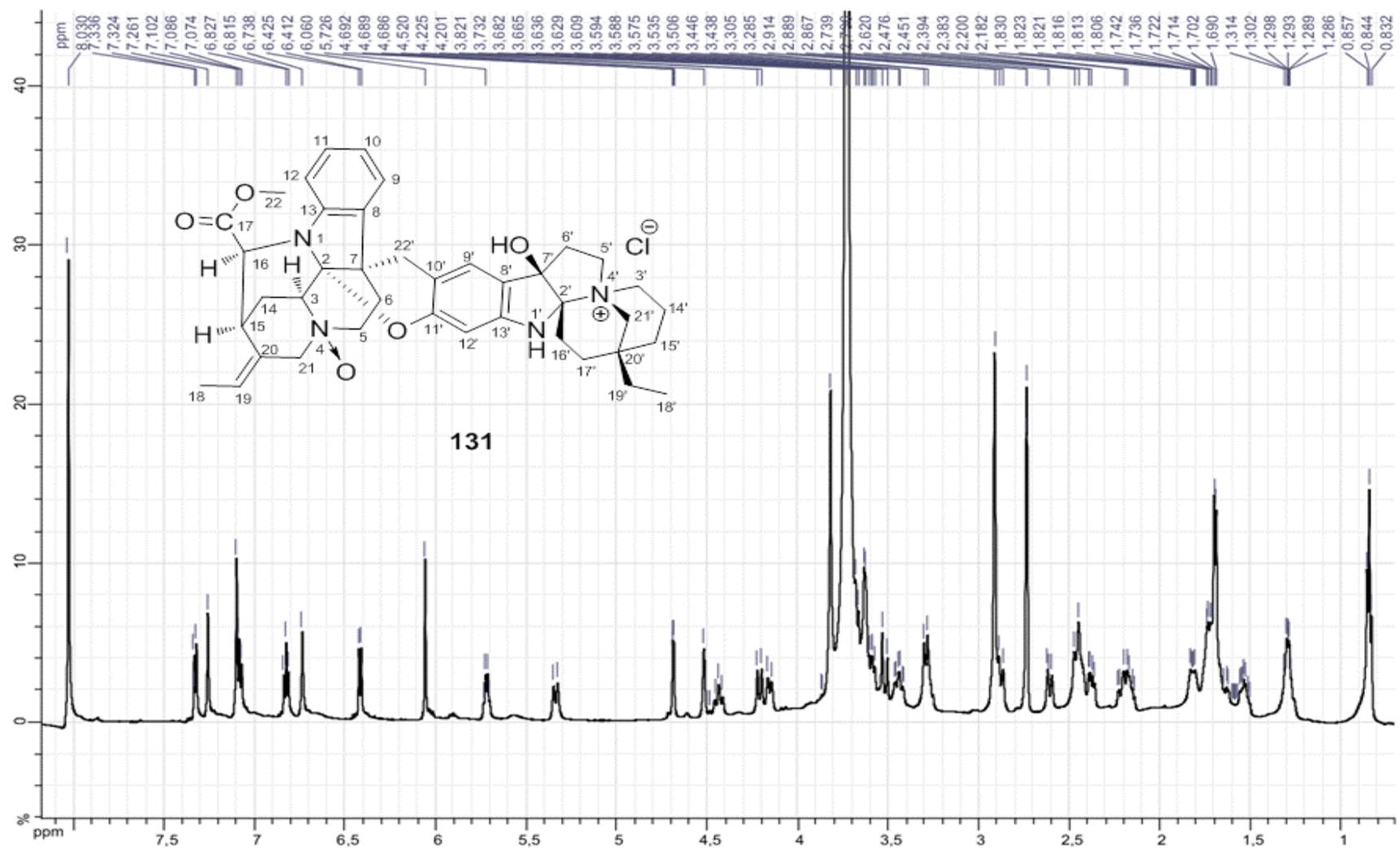
Annexe 7 : Spectres RMN ^1H et ^{13}C des goniomedines C-E

Spectre RMN ^1H de la goniomedine C (**130**) à 600 MHz dans le DMF- d_7 .

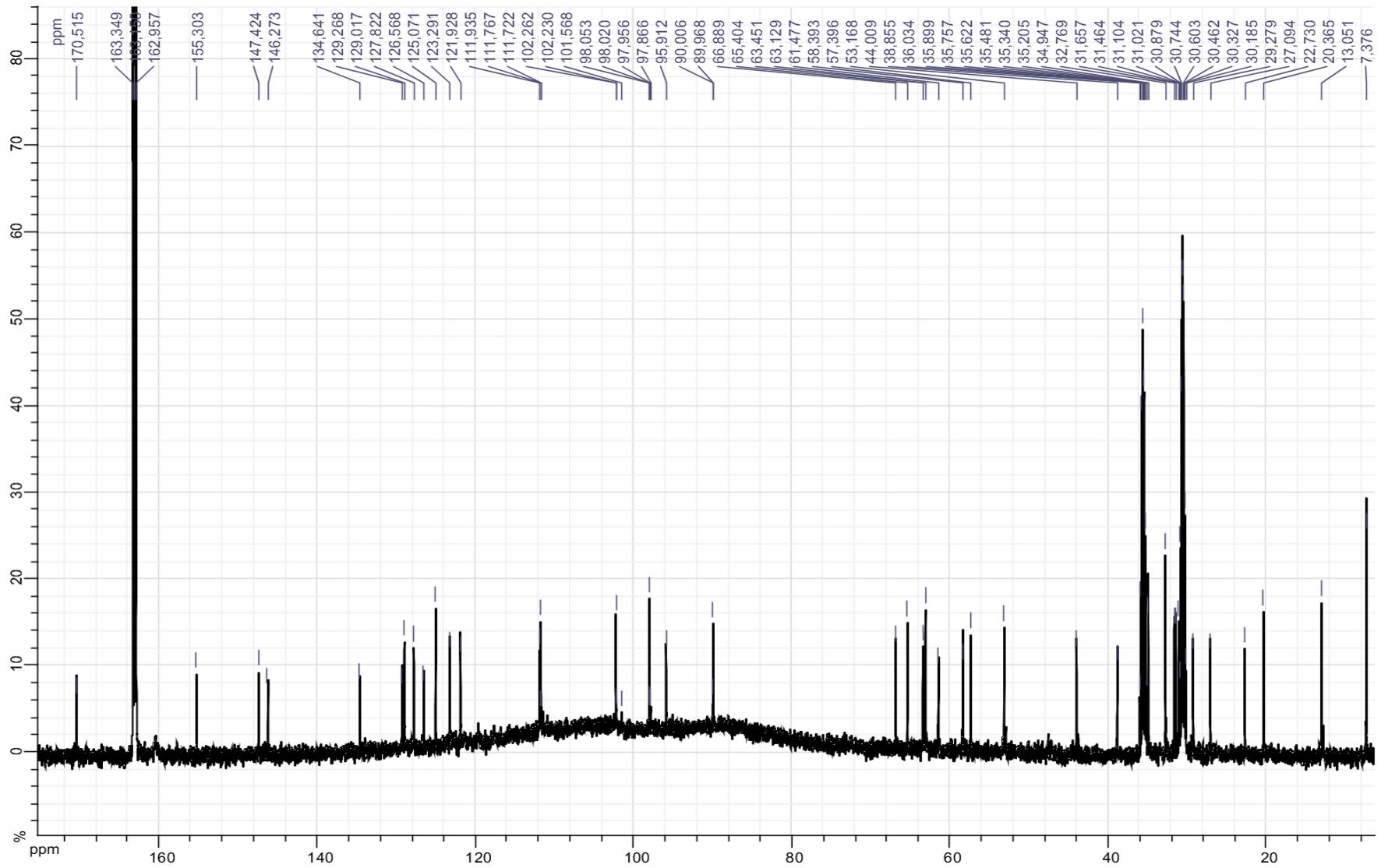


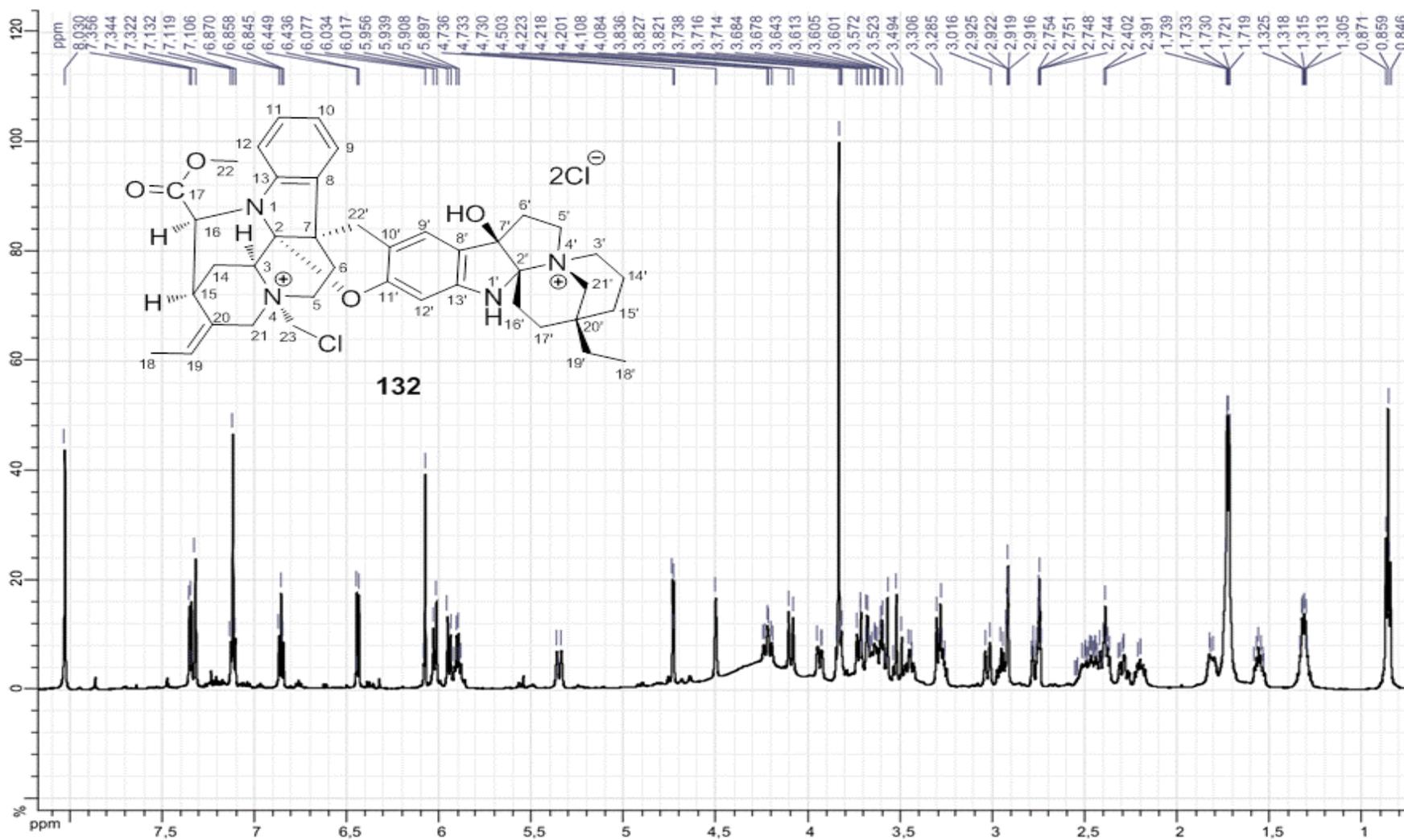
Spectre RMN ^{13}C de la goniomedine C (**130**) à 150 MHz dans le $\text{DMF-}d_7$.



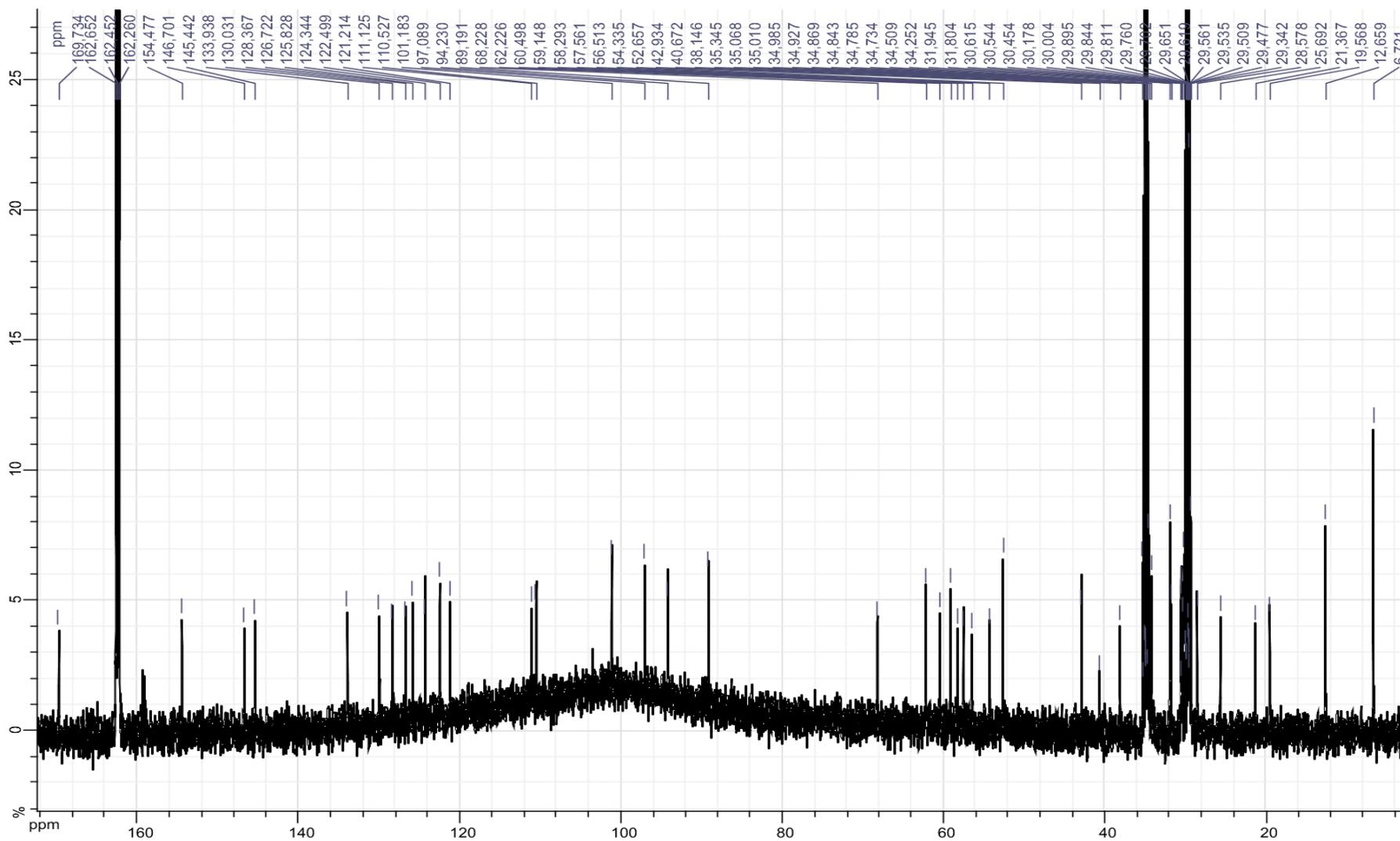
Spectre RMN ^1H de la goniomedine D (**131**) à 600 MHz dans le $\text{DMF-}d_7$.

Spectre RMN ^{13}C de la goniomedine D (**131**) à 150 MHz dans le $\text{DMF-}d_7$.



Spectre RMN ^1H de la goniomedine E (**132**) à 600 MHz dans le $\text{DMF-}d_7$.

Spectre RMN ^{13}C de la goniomedine E (**132**) à 150 MHz dans le DMF- d_7 .

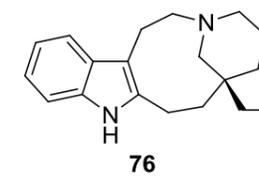
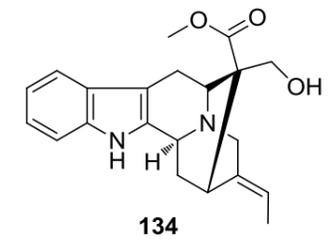
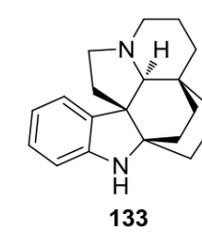
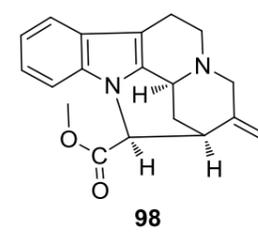
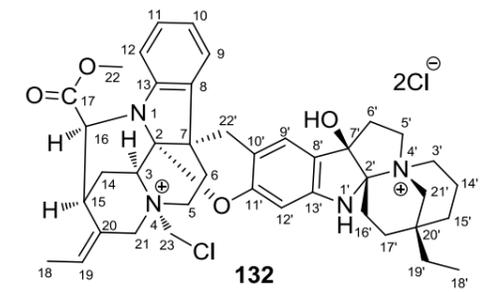
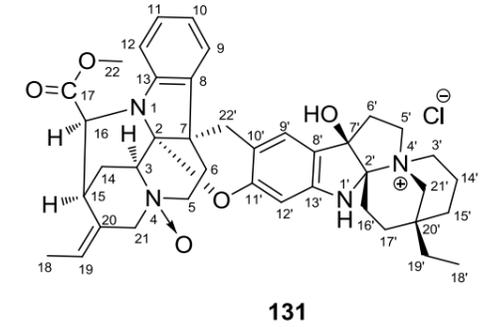
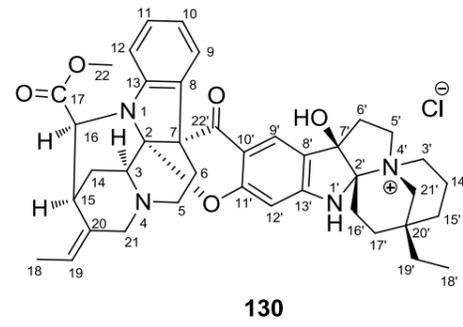
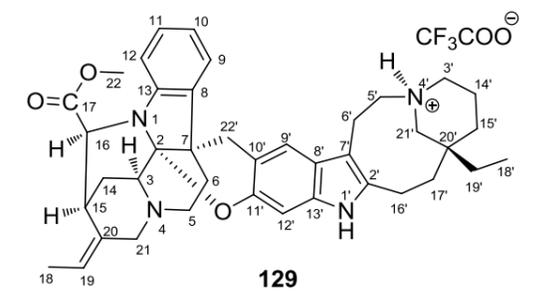
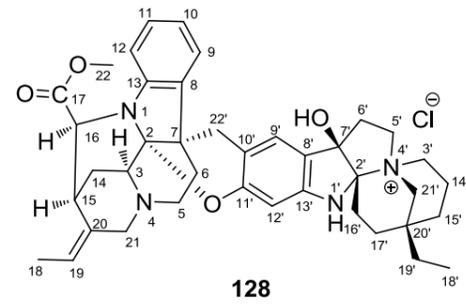


Position	128		129		130		131		132	
	δ_{H} (mult, J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, Hz)	δ_{C}
2		93,3		94,3		98,6		95,9		94,2
3	4,15 (1H, br s)	50,4	4,32 (1H, br s)	51,6	4,08 (1H, br s)	51,1	4,52 (1H, br s)	65,4	4,51 (1H, m)	59,1
5	3,38 (1H, br d, 13) ; 3,86 (1H, td, 13, 5)	46,2	3,39 (1H, m) ; 3,91 (1H, m)	47,0	3,22 (1H, m) ; 3,29 (1H, m)	48,4	4,16 (1H, br d, 13) ; 4,44 (1H, td, 13, 2,6)	63,4	3,94 (1H, br d, 14) ; 4,22 (1H, td, 14, 3)	54,3
6	2,22 (2H, m)	30,7	2,24 (2H, m)	31,5	2,01 (1H, td, 15, 3) ; 3,16 (1H, d, 15,1)	26,6	2,20 (1H, m) ; 2,46 (1H, m)	35,4	2,28 (1H, m) ; 2,41 (1H, m)	31,9
7		43,1		44,6		56,3		44,0		42,9
8		134,3		135,4		130,4		134,6		133,9
9	7,33 (1H, d, 8)	121,9	7,23 (1H, d, 7,2)	123,0	7,05 (1H, d, 7,3)	123,2	7,33 (1H, d, 7,3)	123,2	7,35 (1H, d, 7,3)	122,5
10	6,84 (1H, dd, 7,6, 7)	120,6	6,72 (1H, t, 7,3)	121,2	6,93 (1H, t, 7,3)	122,2	6,83 (1H, t, 7,3)	121,9	6,86 (1H, t, 7,3)	121,2
11	7,10 (1H, ddd, 7,6, 7, 2)	127,8	7,01 (1H, t, 7,6)	128,4	7,23 (1H, t, 7,6)	129,6	7,09 (1H, t, 7,6)	129,0	7,13 (1H, t, 7,6)	128,3
12	6,42 (1H, d, 8)	110,8	6,37 (1H, d, 7,2)	111,5	6,56 (1H, d, 7,3)	111,8	6,42 (1H, d, 7,3)	111,7	6,44 (1H, d, 7,3)	111,1
13		145,5		146,6		147,1		146,2		145,4
14	2,14 (1H, m) ; 2,93 (1H, m)	24,9	2,12 (1H, br d, 13,9) ; 3,00 (1H, br d, 13,9)	25,8	2,17 (1H, m) ; 2,90 (1H, m)	26,0	2,61 (1H, br d, 13) ; 2,88 (1H, m)	22,7	2,77 (1H, dt, 14, 3) ; 3,03 (1H, dt, 14, 3)	21,3
15	3,59 (1H, m)	30,2	3,61 (1H, m)	31,3	3,65 (1H, m)	31,1	3,63 (1H, m)	31,6	3,68 (1H, m)	30,5
16	4,66 (1H, d, 4)	57,1	4,75 (1H, d, 3,5)	58,1	4,79 (1H, d, 3,9)	58,1	4,69 (1H, d, 3,9)	58,3	4,73 (1H, d, 3,8)	57,5
17		169,6		170,7		170,2		170,5		169,7
18	1,65 (3H, dd, 6,7, 1,9)	11,9	1,65 (3H, dd, 6,7, 1,9)	12,9	1,66 (3H, dd, 6,7, 1,9)	12,9	1,69 (3H, dd, 6,7, 1,9)	13,0	1,73 (3H, dd, 6,7, 1,9)	12,6
19	5,65 (1H, qd, 6,7, 1,9)	124,2	5,64 (1H, q, 6,7)	125,1	5,64 (1H, q, 6,7)	125,1	5,72 (1H, q, 6,7)	127,8	5,90 (1H, q, 6,7)	130,0
20		130,2		131,4		131,4		129,2		126,7
21	4,74 (1H, br d, 13) ; 3,82 (1H, m)	52,0	3,81 (1H, m) ; 4,76 (1H, m)	52,8	3,70 (1H, m) ; 4,59 (1H, br d, 13)	52,5	4,21 (1H, d, 14,2) ; 5,34 (1H, d, 14)	66,8	4,09 (1H, d, 14) ; 5,35 (1H, d, 14)	58,2
22	3,83 (3H, s)	52,2	3,82 (3H, s)	53,2	3,84 (3H, s)	53,2	3,82 (3H, s)	53,1	3,84 (3H, s)	52,6
23									5,95 (1H, d, 10) ; 6,03 (1H, d, 10)	68,2
2'		100,8		139,0		101,1		102,2		101,8
3'	3,44 (1H, td, 13, 5) ; 3,65 (1H, dd, 13, 5)	56,2	3,33 (1H, m)	56,3	3,56 (1H, m) ; 3,72 (1H, m)	57,6	3,44 (1H, td, 13, 4) ; 3,63 (1H, m)	57,3	3,45 (1H, td, 13, 4) ; 3,65 (1H, m)	56,5
4'			6,48 (1H, m)							
5'	3,31 (1H, m) ; 3,59 (1H, m)	60,3	3,08 (1H, m) ; 3,40 (1H, td, 13, 3)	52,5	3,44 (1H, m) ; 3,70 (1H, m)	61,4	3,28 (1H, m) ; 3,59 (1H, m)	61,4	3,28 (1H, m) ; 3,61 (1H, m)	60,5
6'	2,41 (1H, m) ; 2,91 (1H, m)	37,8	3,24 (1H, dd, 15, 3,5) ; 3,55 (1H, m)	19,8	2,50 (1H, m) ; 3,02 (1H, dt, 14, 7)	38,7	2,38 (1H, dd, 14, 7) ; 2,90 (1H, m)	38,8	2,38 (1H, m) ; 2,95 (1H, td, 13, 7)	38,1
7'		88,9		102,9		89,2		89,9		89,1
8'		125,0		125,1		129,2		126,5		125,8
9'	7,12 (1H, s)	124,0	7,31 (1H, s)	118,0	7,88 (1H, s)	124,1	7,10 (1H, s)	125,0	7,12 (1H, s)	124,34
10'		110,6		113,1		112,7		111,9		110,5
11'		154,6		150,8		155,8		155,3		154,4
12'	6,05 (1H, s)	96,7	6,58 (1H, s)	97,2	6,30 (1H, s)	97,4	6,06 (1H, s)	98,0	6,08 (1H, s)	97,0
13'		146,3		136,0		162,1		147,4		146,7
14'	1,84 (1H, m) ; 2,46 (1H, m)	19,2	2,31 (1H, m) ; 1,76 (1H, d, 14,6)	20,7	1,85 (1H, m) ; 2,61 (1H, m)	20,4	1,82 (1H, m) ; 2,46 (1H, m)	20,3	1,81 (1H, m) ; 2,52 (1H, m)	19,5
15'	1,74 (1H, m) ; 1,55 (1H, td, 13,2, 6,3)	30,3	1,59 (1H, td, 13, 4,5) ; 1,45 (1H, m)	31,1	1,59 (1H, td, 12,9, 6,4) ; 1,73 (1H, m)	31,3	1,54 (1H, td, 13, 7) ; 1,68 (1H, m)	31,1	1,55 (1H, td, 13, 7) ; 1,74 (1H, m)	30,6
16'	2,17 (1H, m) ; 2,47 (1H, m)	28,3	2,88 (2H, m)	20,8	2,32 (1H, m) ; 2,53 (1H, m)	29,1	2,16 (1H, m) ; 2,45 (1H, m)	29,2	2,21 (1H, m) ; 2,45 (1H, m)	28,5
17'	1,73 (2H, m)	30,0	1,94 (2H, m)	32,0	1,53 (1H, m) ; 1,77 (1H, m)	31,1	1,74 (2H, m)	31,4	1,74 (2H, m)	30,4
18'	0,86 (3H, t, 7,6)	6,4	0,87 (3H, t, 7,4)	7,7	0,88 (3H, t, 7,4)	7,3	0,84 (3H, t, 7,4)	7,3	0,86 (3H, t, 7,3)	6,7
19'	1,31 (2H, q, 7,6)	33,9	1,36 (1H, m) ; 1,47 (1H, m)	30,6	1,34 (2H, m)	34,9	1,30 (2H, m)	34,9	1,31 (2H, m)	34,2
20'		31,6		38,1		32,6		32,7		31,8
21'	3,29 (1H, d, 12) ; 3,69 (1H, d, 12)	61,9	2,89 (1H, m) ; 4,46 (1H, d, 12,5)	56,38	3,37 (1H, d, 12) ; 3,78 (1H, d, 12)	63,3	3,29 (1H, d, 12) ; 3,69 (1H, d, 12)	63,1	3,30 (1H, d, 13) ; 3,73 (1H, d, 13)	62,2
22'	3,49 (1H, d, 17,2) ; 3,53 (1H, d, 17,2)	25,7	3,58 (1H, d, 16,5) ; 3,76 (1H, d, 16,5)	27,8		187,0	3,52 (1H, m) ; 3,65 (1H, m)	27,0	3,51 (1H, d, 17) ; 3,58 (1H, d, 17)	25,6
1'NH	7,16 (1H, s)		10,90 (1H, s)		8,89 (1H, s)		7,27 (1H, s)		7,32 (1H, s)	

Annexe 8 : Données RMN ^1H et ^{13}C des goniomedines de
Gonioma malagasy



Soulevez la page S.V.P.



Annexe 9 : Composés isolés des écorces de *Gonioma malagasy*



Soulevez la page S.V.P.

Publications

Diarylheptanoid Glucosides from *Pyrostria major* and Their Antiprotozoal Activities

Mehdi A. Beniddir,^[a] Philippe Grellier,^[b] Philippe Rasoanaivo,^[c] Philippe M. Loiseau,^[d] Christian Bories,^[d] Vincent Dumontet,^[a] Françoise Guéritte,^[a] and Marc Litaudon^{*[a]}

Keywords: Natural products / Medicinal chemistry / Carbohydrates / Structure elucidation / Configuration determination

Eight new diarylheptanoid glucosides **1–8** have been isolated from the leaves of *Pyrostria major* (A. Rich & DC.) Cavaco [syn. *Canthium major* (A. Rich & DC.)] Cavaco. Their structures were determined by 1D and 2D NMR spectroscopic and HRMS analyses. The absolute configurations of the diarylheptanoids **1–4** were determined to be *3S* and *5S* by the application of the CD exciton chirality method to the corresponding 3,5-bis(*p*-bromobenzoyl) (**1–3**) and 3,5-bis(*p*-di-

methylaminobenzoyl) (**4**) derivatives. Their antiparasitic activities against *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* (amastigote forms), and *Trypanosoma brucei* (trypomastigote bloodstream forms) as well as their cytotoxic activities against the HL-60, KB, and MRC5 cell lines of naturally occurring diarylheptanoid glucosides and their derivatives are reported.

Introduction

Neglected tropical diseases are a group of chronic, disabling, and disfiguring pathologies caused by parasitic, bacterial, and other infections. Among numerous parasitic diseases, malaria is the most important one in the world. It represents a major problem for public health services in tropical and subtropical regions of the planet. About 300 million people contract malaria each year, with 2–3 million dying annually,^[1] mainly due to an increase in parasite resistance to available drugs and the failure to apply existing effective drugs in areas where they would be of greatest benefit. The introduction of new drugs, notably the artemisinin-based combination therapies or ACTs,^[2] could replace ineffective treatments (chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine), but remain more expensive than single-agent treatments.^[3] In addition, lately, there have been signs that the efficacy of ACTs and artesunate monotherapy have decreased in western Cambodia.^[4] There is therefore an urgent need for the discovery of new efficient and cheap anti-malarial drugs to cure this disease and to prevent the emergence of resistance. Recently, we screened a series of 40

plant extracts prepared from various species of the Madagascarian biodiversity for their inhibitory activity against blood stages of the *Plasmodium falciparum* strain. The results of this screening led us to investigate chemically the leaves of *Pyrostria major* (Rubiaceae). The ethyl acetate extract yielded, besides β -sitosterol as one of the major components, eight new diarylheptanoid glucosides **1–8** (Scheme 1), closely related to the previously reported *Tacca chantrieri* metabolites.^[5] If β -sitosterol displayed moderate antiplasmodial activity, the diarylheptanoid glucosides were found to be inactive. However, we discovered by chance that minor structural modifications of these glucosides led to active compounds. Moreover, despite the fact that a large number of Rubiaceae species have been chemically investigated, so far no studies have revealed the presence of diarylheptanoids in this family. Naturally occurring diarylheptanoids are common in Zingiberaceae and Betulaceae, and are encountered in many small botanical families such as Myricaceae and Casuarinaceae.^[6] They possess various biological activities, such as anti-inflammatory, antioxidant, and anti-tumoral properties.^[7]

In this paper we describe the isolation, structure elucidation, and biological activities of the natural diarylheptanoid glucosides and their derivatives.

Results and Discussion

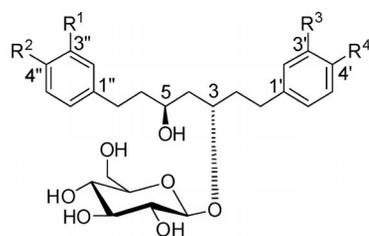
The leaves of *Pyrostria major* (375 g) were extracted with EtOAc to give a dry crude extract (13 g) after removal of the solvent. This extract exhibited a significant antiplasmodial activity (100% at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) with no cytotoxicity against the MRC-5 cell line. It was subjected to silica gel chromatography using as eluent a gradient of CH_2Cl_2 /

[a] Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Labex LERMIT, 1, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France
Fax: +33-1-69077247
E-mail: marc.litaudon@icsn.cnrs-gif.fr

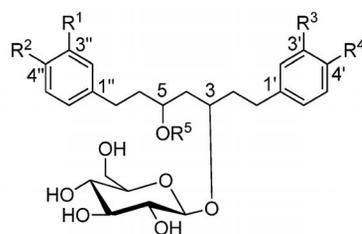
[b] Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7245 CNRS, Team APE, CP 52, 61, Rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France

[c] Institut Malgache de Recherches Appliquées, B. P. 3833, 102 Antananarivo, Madagascar

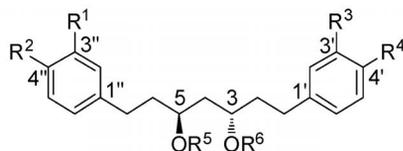
[d] Groupe Chimiothérapie Antiparasitaire UMR 8076 CNRS, Labex LERMIT, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Rue Jean-Baptiste-Clément, 92296 Châtenay Malabry Cedex, France



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	H	OMe	H	OMe
2	H	OMe	OH	OMe
3	H	OMe	OH	OH
4	OH	OH	OH	OH



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
5	OH	OMe	OMe	H	H
6	OH	OMe	OH	OH	H
7	H	OMe	OH	OH	CHO
8	OH	OH	OH	OH	CHO



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
1a	H	OMe	H	OMe	H	H
1b	H	OMe	H	OMe	<i>p</i> -Br-Bz	<i>p</i> -Br-Bz
2a	H	OMe	OH	OMe	H	H
2b	H	OMe	OMe	OMe	H	H
2c	H	OMe	OMe	OMe	<i>p</i> -Br-Bz	<i>p</i> -Br-Bz
3a	H	OMe	OH	OH	H	H
4a	OH	OH	OH	OH	H	H
4b	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H
4c	OMe	OMe	OMe	OMe	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂ -Bz	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂ -Bz

Scheme 1. Chemical structures of natural diarylheptanoid glucosides **1–8** and their derivatives **1a**, **1b**, **2a–2c**, **3a**, **4a–4c**.

MeOH (1:0 to 8:2) of increasing polarity, which led to 16 fractions. Only fraction 5, mainly containing β -sitosterol, showed a significant antiplasmodial activity (100% at 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). All the fractions were then subjected to HPLC analysis to assess qualitatively and quantitatively their chemical content. Owing to their highly complex compositions, we decided to investigate chemically fractions 15 and 16, and subsequent HPLC preparative purification afforded compounds **1–8** (Figure 1).

Compounds **1–8** are closely related to the diarylheptanoids isolated from the rhizomes of *Tacca chantrieri*.^[5] Indeed, they share several common spectral characteristics: The UV spectra show absorption bands at 223 and 278 nm, consistent with substituted aromatic rings, and the IR spectra exhibit bands arising from hydroxy groups (3350 cm^{-1}) and aromatic rings (1600 cm^{-1}). The ¹H NMR spectra show signals for substituted aromatic rings, an aliphatic moiety, and an anomeric proton belonging to a sugar moiety.

Compound **1** was obtained as an amorphous solid. HRESIMS indicates a $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion peak at $m/z = 529.2406$, which suggests a molecular formula of $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_9$. The ¹H NMR spectrum shows signals for two 1,4-disubstituted aromatic ring protons [$\delta_{\text{H}} = 6.80$ (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 7.09 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), and 7.14 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H) ppm]. In addition, a signal for two methoxy groups [$\delta_{\text{H}} = 3.74$ (s, 2×3 H, 4'-OMe and 4''-OMe) ppm] and a signal due to an anomeric proton [$\delta_{\text{H}} = 4.39$ (d, $J = 7.8$ Hz) ppm] are observed, which indicate the β configuration. Hydrolysis of **1** gave D-glucose and **1a**. D-Glucose, including its absolute configuration, was identified by direct supercritical fluid chromatography (SFC) analysis of the hydrolysate lyophilized against D- and L-glucose as references. The ¹³C and DEPT 135 ¹³C NMR spectra reveal signals for 12 sp^2 aromatic carbon atoms and 15 sp^3 carbon atoms, among which there are five methylenes and two hydroxymethines for the aliphatic moiety, one hydroxymethylene and five methines for the sugar moiety, and two methoxy groups, which suggests a diarylheptanoid glucoside structure. Each structural fragment constituting the C₇ unit of **1** was connected by analysis of the ¹H–¹H COSY, HMQC, and HMBC correlations. Finally, HMBC correlations of 2''-H and 6''-H to C-7, and of 2'-H and 6'-H to C-1 allowed the two aromatic rings to be located at the terminal methylene groups. Furthermore, the linkage position of D-glucose at C-3 can be determined by a long-range correlation from the anomeric proton at $\delta_{\text{H}} = 4.29$ ppm to the C-3 carbon at $\delta_{\text{C}} = 78.3$ ppm. All these connectivities are similar to those reported by Yokosuka et al.^[5]

The absolute configurations of the 3,5-dihydroxy groups were determined by application of the CD exciton chirality method^[8] to acyclic 1,3-dibenzoates.^[9] Compound **1a** was converted into the corresponding 3,5-bis(*p*-bromobenzoate) derivative **1b**. Its CD spectrum shows positive (252.7 nm, $\Delta\epsilon = +9.3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and negative (235.5 nm, $\Delta\epsilon = -9.2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) Cotton effects, which is consistent with a positive chirality. Thus, the absolute configurations at C-3 and C-5 were assigned as *S*. The structure of **1** was thus shown to be (3*S*,5*S*)-3,5-dihydroxy-1,7-bis(4-methoxyphenyl)heptyl 3-*O*- β -D-glucopyranoside.

Compound **2** was obtained as an amorphous solid. Its molecular formula was determined to be $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{10}$ on the basis of the ion peak $[\text{M} + \text{Na}]^+$ at $m/z = 545.2410$ in the HRESIMS spectrum. The ¹H NMR spectrum shows aromatic signals for 1,3,4-trisubstituted and 1,4-disubstituted benzene rings, and signals for two methoxy groups. HMBC correlations were observed from the methoxy protons at $\delta_{\text{H}} = 3.72$ ppm to C-4'', and at $\delta_{\text{H}} = 3.78$ ppm to C-4'. Acidic

hydrolysis of **2** gave **2a** and D-glucose. The location of the sugar at C-3 was confirmed by an HMBC correlation of the anomeric proton signal at $\delta_{\text{H}} = 4.39$ ppm to C-3 at $\delta_{\text{C}} = 78.3$ ppm. Compound **2a** was methylated to form the trimethylated derivative **2b**, which was then converted into the 3,5-bis(*p*-bromobenzoate) derivative **2c**. The CD spectrum of **2c** exhibits similar Cotton effects to **1b**. All of these data are consistent with the structure (3*S*,5*S*)-3,5-dihydroxy-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-(4-methoxyphenyl)heptyl 3-*O*- β -D-glucopyranoside, which was assigned to compound **2**.

Compound **3** was obtained as an amorphous solid. The HRESIMS spectrum exhibits a $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion peak at $m/z = 531.2285$, which corresponds to the molecular formula $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_{10}$, lower by CH_2 than that of **2**. The ^1H NMR spectrum of **3** shows signals for a 1,3,4-trisubstituted aromatic ring, a 1,4-disubstituted aromatic ring, and a signal for only one methoxy group. An HMBC correlation between these protons and C-4'' confirmed the location of the methoxy group. Acidic hydrolysis of **3** gave **3a** and D-glucose, and consecutive methylation of **3a** afforded **2b**. Consequently, **3** was identified as (3*S*,5*S*)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-(4-methoxyphenyl)heptyl 3-*O*- β -D-glucopyranoside.

Compound **4** was obtained as an amorphous solid. Its molecular formula $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$ was deduced from the ion peak $[\text{M} + \text{Na}]^+$ at $m/z = 533.2015$ in the HRESIMS spectrum. The ^1H NMR spectrum of **4** exhibits a signal for an anomeric proton at $\delta_{\text{H}} = 4.39$ (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H) ppm and signals for six aromatic protons, but it did not exhibit any signals for methoxy groups. Furthermore, the ^{13}C NMR spectrum shows signals for four oxygenated sp^2 carbon atoms ($\delta_{\text{C}} = 144.2, 144.3, 146.1, \text{ and } 146.2$ ppm), which suggests the presence of two 3,4-dihydroxyphenyl groups. Acidic hydrolysis of **4** gave **4a** and D-glucose. Thus, the planar structure of **4** was identified as 1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxyheptyl 3-*O*- β -D-glucopyranoside by comparison of its NMR spectroscopic data with those reported in the literature.^[5] To assign the absolute configuration of compound **4**, **4a** was methylated to give derivative **4b**, which was converted into the 3,5-bis(*p*-(dimethylamino)benzoate) derivative **4c**. Its CD spectrum exhibits positive (319.8 nm, $\Delta\epsilon = +24.5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and negative (296 nm, $\Delta\epsilon = -22.1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) Cotton effects, which is consistent with a positive chirality by comparison with reported values.^[10] The resulting exciton chirality interaction between the two (dimethylamino)benzoyloxy chromophores, in a redshifted region, provides an unambiguous configurational assignment.^[11] Moreover, compounds **4a** and **4b** are enantiomers of the corresponding arylheptanoids described by Mimaki and co-workers,^[5] as illustrated by their similar values and opposite signs of specific rotation. Thus, compound **4** is shown to be (3*S*,5*S*)-3,5-dihydroxy-1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)heptyl 3-*O*- β -D-glucopyranoside.

Compound **5** was shown to have a molecular formula of $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{10}$ on the basis of the ion peak $[\text{M} + \text{Na}]^+$ at $m/z = 545.2404$ in the HRESIMS spectrum, which is the same as that of **2**. In the HMBC spectrum, correlation was ob-

served from the anomeric proton signal ($\delta_{\text{H}} = 4.39$ ppm) to C-3 ($\delta_{\text{C}} = 78.4$ ppm) of the heptane moiety. Other HMBC correlations indicate that **5** is an isomer of **2**. Unfortunately, the small amount of **5** did not allow us to determine its absolute configuration. However, compound **5** is supposed to have the same absolute configuration as compounds **1–4** on the basis of the same negative sign of their specific rotations. Thus, the structure was tentatively assigned as (3*S*,5*S*)-3,5-dihydroxy-7-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)heptyl 3-*O*- β -D-glucopyranoside.

The molecular formula $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_{11}$ of compound **6** was deduced from the $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion peak at $m/z = 547.2166$ in the HRESIMS spectrum. The ^1H NMR spectrum exhibits a signal for an anomeric proton at $\delta_{\text{H}} = 4.39$ (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H) ppm, signals for six aromatic protons, and a signal for a methoxy group. In addition, the ^{13}C NMR spectrum shows signals for four oxygenated sp^2 carbon atoms at $\delta_{\text{C}} = 144.2, 146.1, 147.2, \text{ and } 147.5$ ppm, which suggests the presence of two 1,3,4-trisubstituted aromatic rings. HMBC correlations between the anomeric proton and C-3 confirmed the location of the sugar moiety. The closeness of the carbon resonances of C-3'' ($\delta_{\text{C}} = 147.5$ ppm) and C-4'' ($\delta_{\text{C}} = 147.2$ ppm) makes it difficult to determine the attachment of the methoxy group. The NOESY correlation between the aromatic proton 5''-H at $\delta_{\text{H}} = 6.80$ ppm and the methoxy protons at $\delta_{\text{H}} = 3.81$ ppm confirmed the location of this group at C-4''. Thus, the planar structure of **6** was elucidated as 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)heptyl 3-*O*- β -D-glucopyranoside. The negative sign of the specific rotation of **6**, similar to compounds **1–4**, allowed us to tentatively assign the absolute configuration 3*S*,5*S* to compound **6**.

Compound **7** was obtained as an amorphous solid. Its molecular formula $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_{11}$ was deduced from the quasi-molecular peak $[\text{M} + \text{Na}]^+$ at $m/z = 559.2241$ in the HRESIMS spectrum. Comparison of the ^1H and DEPT ^{13}C NMR spectra of **7** and **3** revealed that **7** is closely related to **3** but the spectra contain additional deshielded signals at $\delta_{\text{H}} = 5.19$ (m, 1 H) and 8.12 (s, 1 H) ppm, and at $\delta_{\text{C}} = 163.5$ ppm. These data, along with the presence of a strong IR absorption at 1710 cm^{-1} , clearly indicate the presence of a formyloxy group. The HMBC correlation between the formyl proton at $\delta_{\text{H}} = 8.12$ ppm and the C-5 carbon at $\delta_{\text{C}} = 73.1$ ppm confirmed that the formyloxy group is attached to carbon C-5. Compound **7** is therefore the formyl ester of **3** and the planar structure of **7** was assigned as 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-formyl-3-hydroxy-7-(4-methoxyphenyl)heptyl 3-*O*- β -D-glucopyranoside. The negative sign of the specific rotation of **7**, similar to compounds **1–4**, allowed us to assign tentatively the absolute configuration 3*S*,5*S* to compound **7**.

Compound **8** ($\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$) was assigned as a diarylheptanoid glucoside structurally related to **4**. The ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data for **8** are very similar to those of compound **4** but with signals for an additional formyl group, as was the case for **7**. The location of this group at C-5 was deduced from HMBC correlation between the formyl proton at $\delta_{\text{H}} = 8.12$ ppm and the C-5 carbon at $\delta_{\text{C}} =$

73.1 ppm. Other ^1H – ^1H COSY and HMBC correlations are similar to those of compound **4** and confirm that compound **8** is 1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-5-formyl-3-hydroxyheptyl 3-*O*- β -D-glucopyranoside. The negative sign of the specific rotation of **8**, similar to compounds **1**–**4**, allowed us to assign tentatively the absolute configuration 3*S*,5*S* to compound **8**.

Naturally occurring diarylheptanoid glucosides and their derivatives were evaluated in vitro for their antiparasitic activity against *Plasmodium falciparum* (erythrocytic stage), *Leishmania donovani* (amastigote forms), and *Trypanosoma brucei* (trypomastigote bloodstream forms) as well as for their cytotoxic activity against the HL-60, KB, and MRC-5 cell lines (Table 1). The diarylheptanoid glucosides and their derivatives showed weak or no antiparasitic activity and no cytotoxic activity except for the derivatives **4b** and **4c** against *P. falciparum*, compound **2c** against the intramacrophage amastigotes of *L. donovani*, and compound **6**, which exhibited significant antitrypanosomal activity. Although the antiplasmodial activity is low, because compounds are considered interesting in vitro against *P. falciparum* with activities in the nanomolar range, the antileishmanial activity of compound **2c** and the antitrypanosomal activity of compound **6** against *T. brucei* in the micromolar range, compared with pentamidine, could justify further in vivo evaluation.

Table 1. Antiplasmodial, antileishmanial, and antitrypanosomal activities of compounds **1**–**8** and their derivatives.^[a]

Compound	IC ₅₀ [μM]		
	<i>P. falciparum</i> strain FcB1	<i>L. donovani</i> LV9 intramacrophage amastigotes	<i>T. brucei</i> CMP strain, MEC
1	>20	39.7 \pm 3.2	>100
1a	60.40 \pm 0.92	53.0 \pm 4.2	>100
1b	27.25 \pm 7.25	35.0 \pm 2.8	>100
2	>20	31.2 \pm 2.5	>100
2a	40.78 \pm 1.03	37.4 \pm 2.9	50
2b	32.71 \pm 3.47	66.8 \pm 5.3	50
2c	16.45 \pm 0.79	10.5 \pm 0.8	25
3	>20	33.2 \pm 2.6	>100
3a	25.39 \pm 2.44	58.5 \pm 4.7	25
4	>20	33.3 \pm 2.6	25
4a	45.44 \pm 2.31	67.5 \pm 5.4	50
4b	4.1 \pm 0.8	>100	50
4c	4.5 \pm 0.2	26.1 \pm 2.0	>100
5	>20	41.4 \pm 3.3	>100
6	>20	>100	12.5
7	>20	33.0 \pm 2.6	25
8	>20	34.6 \pm 2.7	25
Chloroquine	0.05 \pm 0.02	n.d.	n.d.
Pentamidine	n.d.	11.2 \pm 1.3	3.1
Amphotericin B	n.d.	0.10 \pm 0.02	n.d.

[a] Data are IC₅₀ values in μM \pm standard errors and are the average of three independent experiments unless indicated otherwise. FcB1: Chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum*; MEC: minimum effective concentration; n.d.: not done.

Although compounds **4b** and **4c** exhibited a moderate antiplasmodial activity (IC₅₀ = 4.1 and 4.5 μM , respectively), they showed no cytotoxic activity against the MRC-

5, KB, and HL-60 cell lines (at >100 μM for **4b** and >25 μM for **4c**), which makes **4b** a good candidate for the preparation of analogues for further study. Note that, in contrast to **4b**, its enantiomer was reported to be cytotoxic against the HL-60 cancer cell line^[6] (IC₅₀ = 12.1 μM). The lack of cytotoxic activity of saturated arylheptanoids was confirmed by Ishida et al.,^[12] who showed that the saturation of the olefinic bonds of curcumin analogues eliminated cytotoxic activity. The antiplasmodial activity of the EtOAc leaves extract is probably due to the presence of β -sitosterol (IC₅₀ = 2.1 μM) as a major constituent of the extract. This activity could be due to a stomatocytogenic effect, as was reported for lupeol.^[13] Further investigation using transmission electron microscopy would be required to confirm this hypothesis.

Conclusions

A chemical investigation of the ethyl acetate extract of leaves of *Pyrostria major* led to the isolation of eight new diarylheptanoid glucosides **1**–**8**, described for the first time in a plant of the Rubiaceae family. Their absolute configurations were successfully determined by the CD exciton chirality^[4] method. Surprisingly, this structural study has allowed us to obtain two selective antiplasmodial compounds **4b** and **4c** with no cytotoxicity, as well as a potential antileishmanial-active compound **2c**. Further structure–activity relationship studies, as well as in vivo experimentation, are expected to identify serious drug candidates for use against malaria and leishmaniasis.

Experimental Section

General Procedures: Optical rotations were measured at 25 °C with a JASCP P1010 polarimeter. IR spectra were recorded with a Nicolet FTIR 205 spectrophotometer. The UV spectra were recorded with a Perkin–Elmer Lambda 5 spectrophotometer. CD spectra were recorded at 25 °C with a JASCO J-810 spectropolarimeter using the software SpecDis version 1.51.^[14] The NMR spectra were recorded with a Bruker Avance 500 instrument for all compounds except **2**–**4** for which a Bruker 300 MHz instrument was employed. CD₃OD or CDCl₃ was used as solvent. HRESIMS were recorded with a Thermoquest TLM LCQ Deca ion-trap spectrometer. Kromasil analytical and preparative C₁₈ columns (250 \times 4.6 mm, 250 \times 21.2 mm i.d. 5 μm Thermo) were used for preparative HPLC separations using a “Waters autopurification system” equipped with a sample manager (Waters 2767), a column fluidics organizer, a binary pump (Waters 2525), a UV/Vis diode-array detector (190–600 nm, Waters 2996), and a PL-ELS 1000 ELSD Polymer Laboratory detector. SFC analyses were performed with a Thar Waters SFC Investigator II System using a photodiode array detector (Waters 2998), an ELS detector (Waters 2424), and a chiralpack analytical IA column (250 \times 4.6 mm, 5 μm , Daicel Chemical industries). Silica gel 60 (6–35 μm) and analytical TLC plates (silica gel 60 F254) were purchased from SDS (France). All other chemicals and solvents were purchased from SDS (France).

Plant Material: Leaves of *Pyrostria major* were collected in the Mahanoro region of the Eastern coastal rainforest of Madagascar in September 2005. The plant was identified by Armand Rakotozafy

by comparison with an authentic specimen held in the Department of Botany, Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza, Antananarivo. Botanical identification was confirmed by Dr. Sylvain Razafimandimbison (The Bergius Foundation, Royal Swedish Academy of Sciences, SE-10504, Stockholm, Sweden). A voucher specimen (MAD-0086) was deposited at the Institut Malgache de Recherches Appliquées.

Extraction and Isolation: The plant material (dry wt., 375 g) was extracted with EtOAc three times (each 2 L) at 40 °C. The EtOAc extract was concentrated in vacuo at 40 °C to yield 13 g of residue. The EtOAc extract (10 g) was subjected to silica gel column chromatography by using a gradient of CH₂Cl₂/MeOH (1:0 to 8:2) of increasing polarity, which gave 16 fractions on the basis of TLC. Fraction 5 (63.2 mg) was identified as β-sitosterol. Fraction 15 (200 mg) was subjected to preparative C₁₈ column chromatography by using the mobile phase MeOH/H₂O (60:40 to 100:0 + 0.1% formic acid) over 20 min at 21 mL min⁻¹ to afford **1** (80 mg, 6.2 × 10⁻⁶%), **2** (50 mg, 2.7 × 10⁻⁶%), and **5** (4 mg, 7 × 10⁻⁷%). Fraction 16 (400 mg) was subjected to preparative C₁₈ chromatography by using MeOH/H₂O (40:60 to 70:30 + 0.1% formic acid) over 20 min at 21 mL min⁻¹ to afford **3** (30 mg, 5.2 × 10⁻⁶%), **4** (20 mg, 3.87 × 10⁻⁶%), **6** (2 mg, 3.4 × 10⁻⁷%), **7** (2 mg, 3.4 × 10⁻⁷%), and **8** (2 mg, 3.4 × 10⁻⁷%).

Compound 1: Amorphous solid. [α]_D²⁵ = -39 (*c* = 0.05, MeOH). UV (MeOH): λ_{\max} [log(ϵ /M⁻¹ cm⁻¹)] = 224 [4.36], 278 nm [3.6]. IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ = 1634, 1512, 1244, 1078, 710, 2155, 3220 cm⁻¹. ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ_{H} = 1.61–1.75 (m, 4 H, 4-H₂, 6-H₂), 1.79 (m, 1 H, 2a-H), 1.93 (m, 1 H, 2b-H), 2.56 (m, 1 H, 7a-H), 2.64 (t, *J* = 8.5 Hz, 2 H, 1-H₂), 2.68 (m, 1 H, 7b-H), 3.19 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Glc-2), 3.26 (m, 1 H, Glc-5), 3.33 (m, 1 H, Glc-4), 3.34 (m, 1 H, Glc-3), 3.71 (d, *J* = 11.8, 5.5 Hz, 1 H, Glc-6a), 3.74 (s, 2 × 3 H, 2 × OMe), 3.87 (dd, *J* = 11.8, 2.7 Hz, 1 H, Glc-6b), 3.91 (m, 1 H, 5-H), 3.96 (m, 1 H, 3-H), 4.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Glc-1), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, 2''-H, 6''-H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, 2'-H, 6'-H) ppm. ¹³C NMR: see Table 2. HRMS (ESI): calcd. for C₂₇H₃₈O₉Na [M + Na]⁺ 529.2414; found 529.2406.

Acid Hydrolysis of 1: Compound **1** (23 mg) in 1 N HCl (10 mL) was heated at 100 °C for 10 h. The resulting hydrolysate was extracted with EtOAc (3 × 10 mL), dried (Na₂SO₄), and evaporated under reduced pressure to afford pure **1a** (14 mg). The aqueous phase was freeze-dried. The residue containing the sugar was analyzed by SFC under the following conditions: Co-solvent (%): MeOH (12%), CO₂ flow rate: 3.52 mL min⁻¹, co-solvent flow rate: 0.48 mL min⁻¹, total flow: 4 mL min⁻¹, detection: ELSD. The D-glucose present in the sugar fraction was identified by comparison of its retention time with those of authentic samples of D- and L-glucose [*t*_R = 5.20/6.20 (α/β form) and 4.50/5.50 min (α/β form), respectively].

Compound 1a: Amorphous solid. [α]_D²⁵ = -3.7 (*c* = 0.05, CHCl₃). UV (CHCl₃): λ_{\max} [log(ϵ /M⁻¹ cm⁻¹)] = 241 [3.2], 278 nm [3.5]. IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ = 1513, 1246, 3373, 761, 768 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_{H} = 1.64 (t, *J* = 5.7 Hz, 2 H, 4-H₂), 1.67–1.84 (m, 4 H, 2-H₂, 6-H₂), 2.10 (br. s, 2 H, 3-OH, 5-OH), 2.56–2.72 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.76 (s, 2 × 3 H, 2 × OMe), 3.95 (m, 2 H, 3-H, 5-H), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 4 H, 3'-H, 5'-H, 3''-H, 5''-H), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 4 H, 2'-H, 6'-H, 2''-H, 6''-H) ppm. ¹³C NMR: see Table 2. HRMS (ESI): calcd. for C₂₁H₂₈O₄Na [M + Na]⁺ 367.1885; found 367.1884.

Bis(*p*-bromobenzoate) 1b of 1a: NEt₃ (32 μ L) was added dropwise to a solution of **1a** (13 mg) in anhydrous CH₂Cl₂ (0.6 mL) containing DMAP (15 mg) as catalyst and *p*-bromobenzoyl chloride

Table 2. ¹³C NMR data for compounds **1**, **1a**, **2**, **2a**, **2b**, and **3a**.^[a]

C atom	δ_{C} [ppm]							
	1	1a	2	2a	2b	3	3a	
1	31.6	31.4	31.8	31.7	32.0	31.9	32.5	
2	39.1	39.5	38.9	39.2	39.5	39.1	41.4	
3	78.3	69.1	78.3	69.1	69.2	78.4	69.8	
4	43.1	42.7	42.9	42.7	42.8	43.0	45.7	
5	68.4	69.1	68.4	69.1	69.2	68.5	68.9	
6	41.3	39.5	41.2	39.4	39.5	41.3	41.4	
7	32.3	31.4	32.2	31.4	31.4	32.3	32.2	
1'	136.0 ^[b]	134.0	136.9	135.3	134.7	135.6 ^[b]	135.4	
2'	130.5	129.4	116.8	114.8	111.9	116.9	116.7	
3'	114.9	114.1	147.3	145.7	149.1	146.1	146.2	
4'	159.4	158.0	147.1	145.0	147.5	144.2	144.3	
5'	114.9	114.1	113.0	110.9	111.5	116.4	116.4	
6'	130.5	129.4	120.8	119.9	120.3	120.9	120.8	
1''	135.8 ^[b]	134.0	135.8	134.1	134.0	135.8 ^[b]	135.8	
2''	130.4	129.4	130.4	129.4	129.4	130.4	130.4	
3''	114.8	114.1	114.9	114.1	114.1	114.9	114.9	
4''	159.3	158.0	159.3	158.0	158.1	159.4	159.7	
5''	114.8	114.1	114.9	114.1	114.1	114.9	114.9	
6''	130.4	129.4	130.4	129.4	129.4	130.4	130.4	
Glc	1	104.4	104.2			104.3		
	2	75.6	75.5			75.6		
	3	78.3	78.1			78.4		
	4	71.8	71.7			71.8		
	5	78.0	78.0			78.0		
	6	62.9	62.9			62.5		
	3'-OMe				56.0			
	4'-OMe	55.7	55.4	56.6	56.2	56.1		
	3''-OMe							
	4''-OMe	55.7	55.4	55.7	55.4	55.5	55.8	55.7

[a] Spectra recorded in CD₃OD (**1–3**, **3a**) or CDCl₃ (**1a**, **2a**, **2b**) at 75 (**2**) and 125 MHz (**1–3**, **1a**, **2a**, **2b**, **3a**). [b] May be interchanged.

(40 mg), and the mixture was stirred at 60 °C for 9 h. The reaction mixture was diluted with H₂O (20 mL) and extracted with EtOAc (3 × 10 mL). After concentration of the organic phase, it was purified by chromatography on silica gel eluting with CH₂Cl₂/MeOH (9.5:0.5) to yield **1b** (12 mg).

Compound 1b: Amorphous solid. [α]_D²⁵ = +10 (*c* = 0.1, CHCl₃). UV (CHCl₃): λ_{\max} [log(ϵ /M⁻¹ cm⁻¹)] = 318 [3.6], 247 [4.3], 228 nm [4.1]. CD (EtOH): λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) = 252.7 (+9.31), 235.6 nm (-9.22 M⁻¹ cm⁻¹). IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ = 2930, 2864, 1716, 1589, 1513, 1032, 1011, 848, 809, 682 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_{H} = 1.86–2.08 (m, 4 H, 2-H₂, 6-H₂), 2.10 (m, 2 H, 4-H₂), 2.59 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.73 (s, 2 × 3 H, 2 × OMe), 5.23 (m, 2 H, 3-H, 6-H), 6.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 4 H, 3'-H, 5'-H, 3''-H, 5''-H), 7.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 4 H, 2'-H, 6'-H, 2''-H, 6''-H), 7.43 (d, *J* = 8.5 Hz, 4 H), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 4 H) ppm. ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ_{C} = 30.9 (t, C-1, C-7), 36.4 (t, C-2, C-6), 38.2 (t, C-4), 55.4 (q, 4'-OMe, 4''-OMe), 71.5 (d, C-3, C-5), 114.1 (d, C-3', C-5', C-3'', C-5''), 129.4 (d, C-2', C-6', C-2'', C-6''), 133.2 (s, C-1', C-1''), 158.0 (s, C-4', C-4''); *p*-bromobenzoate substituents: 128.1 (2 s), 129.3 (2 s), 131.2 (4 d), 131.7 (4 d), 165.4 (2 s) ppm. HRMS (ESI): calcd. for C₃₅H₃₄Br₂O₆Na [M + Na]⁺ 731.0620; found 731.0616.

Compound 2: Amorphous solid. [α]_D²⁵ = -31 (*c* = 0.17, MeOH). UV (MeOH): λ_{\max} [log(ϵ /M⁻¹ cm⁻¹)] = 224 [4.36], 278 nm [3.7]. IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ = 3291, 1512, 1432, 1364, 1271, 1232, 1078, 1033, 815 cm⁻¹. ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ_{H} = 1.59–1.74 (m, 4 H, 4-H₂, 6-H₂), 1.75 (m, 1 H, 2a-H), 1.94 (m, 1 H, 2b-H), 2.51–2.73 (m, 4 H, 7-H₂, 1-H₂), 3.19 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Glc-2), 3.26 (m, 1 H, Glc-5), 3.33 (m, 1 H, Glc-4), 3.35 (m, 1 H, Glc-3), 3.71 (dd, *J* = 11.8, 5.5 Hz, 1 H, Glc-6a), 3.72 (s, 3 H, 4''-OMe), 3.78 (s, 3 H, 4'-OMe),

3.87 (dd, $J = 11.8, 2.7$ Hz, 1 H, Glc-6b), 3.91 (m, 1 H, 5-H), 3.96 (m, 1 H, 3-H), 4.39 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, Glc-1), 6.63 (dd, $J = 8.5, 2$ Hz, 1 H, 6'-H), 6.73 (d, $J = 2$ Hz, 1 H, 2'-H), 6.78 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, 5'-H), 6.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.07 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 2''-H, 6''-H) ppm. ^{13}C NMR, see Table 2. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{10}\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 545.2363; found 545.2410.

Acid Hydrolysis of 2: Compound **2** (30 mg) was hydrolyzed by the same procedure as described for **1** to yield **2a** (22 mg). SFC analysis of the sugar fraction under the same conditions as in the case of **1** showed the presence of D-glucose.

Compound 2a: Amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -10$ ($c = 0.1$, CHCl_3). UV (CHCl_3): λ_{max} [$\log(\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$] = 279 nm [3.6]. IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3407, 1590, 1514, 812, 764$ cm^{-1} . ^1H NMR ($\text{CDCl}_3, 500$ MHz): $\delta_{\text{H}} = 1.62$ (t, $J = 5.7$ Hz, 2 H, 4-H₂), 1.66–1.83 (m, 4 H, 2-H₂, 6-H₂), 2.51–2.71 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.76 (s, 3 H, 4'-OMe), 3.83 (s, 3 H, 4'-OMe), 3.94 (m, 2 H, 3-H, 5-H), 6.64 (dd, $J = 8.5, 2$ Hz, 1 H, 6'-H), 6.74 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, 5'-H), 6.75 (d, $J = 2$ Hz, 1 H, 2'-H), 6.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 2''-H, 6''-H) ppm. ^{13}C NMR, see Table 2. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 383.1834; found 383.1816.

Methylation of 2a: Compound **2a** (20 mg) and Cs_2CO_3 (13 mg) were dissolved in THF (0.5 μL). A large excess of CH_3I was added to the reaction mixture, which was stirred at 50 °C for 9 h. The reaction mixture was purified by chromatography on silica gel eluting with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9.5:0.5) to yield **2b** (12 mg).

Compound 2b: Amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -2.5$ ($c = 0.07$, MeOH). UV (MeOH): λ_{max} [$\log(\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$] = 225 [4.8], 279 nm [4.3]. IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3407, 1611, 1590, 1155, 1030, 812, 764$ cm^{-1} . ^1H NMR ($\text{CDCl}_3, 500$ MHz): $\delta_{\text{H}} = 1.65$ (t, $J = 5.7$ Hz, 2 H, 4-H₂), 1.68–1.84 (m, 4 H, 2-H₂, 6-H₂), 2.56–2.73 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.76 (s, 3 H, 4'-OMe), 3.83 (s, 3 H, 4'-OMe), 3.84 (s, 3 H, 3'-OMe), 3.96 (m, 2 H, 3-H, 5-H), 6.70 (d, $J = 2$ Hz, 1 H, 2'-H), 6.71 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1 H, 6'-H), 6.77 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, 5'-H), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.09 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 2''-H, 6''-H) ppm. ^{13}C NMR, see Table 2. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 383.1834; found 383.1816.

Bis(*p*-bromobenzoate) 2c of 2b: Compound **2b** (6 mg) was treated by the same procedure as for **1a** to yield **2c** (6 mg).

Compound 2c: Amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +30$ ($c = 0.1$, CHCl_3). UV (CHCl_3): λ_{max} [$\log(\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$] = 225 [4.3], 246 nm [4.6]. CD (EtOH): λ_{max} ($\Delta\epsilon$) = 253 nm (+15.5), 237 nm (−11.77 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 2930, 1720, 1513, 1480, 1270, 1140, 1016, 809, 755, 682$ cm^{-1} . ^1H NMR ($\text{CDCl}_3, 500$ MHz): $\delta_{\text{H}} = 1.86$ –2.08 (m, 4 H, 2-H₂, 6-H₂), 2.10 (m, 2 H, 4-H₂), 2.59 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.73 (s, 3 H, 4'-OMe), 3.79 (s, 3 H, 4'-OMe), 3.80 (s, 3 H, 3'-OMe), 5.26 (m, 2 H, 3-H, 6-H), 6.63 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1 H, 6'-H), 6.64 (d, $J = 2.0$ Hz, 1 H, 2'-H), 6.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, 5'-H), 6.75 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.02 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 2''-H, 6''-H), 7.43 (d, $J = 8.5$ Hz, 4 H), 7.68 (d, $J = 8.5$ Hz, 4 H) ppm. ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3, 125$ MHz): $\delta_{\text{C}} = 30.9$ (t, C-7), 31.4 (t, C-1), 36.4 (t, C-2, C-6), 38.3 (t, C-4), 55.4 (q, 4'-OMe), 56.0 (q, 4'-OMe), 56.1 (q, 3'-OMe), 71.4–71.5 (d, C-3, C-5), 111.4 (d, C-5'), 111.9 (d, C-2'), 114.0 (d, C-3'', C-5''), 120.3 (d, C-6'), 129.4 (d, C-2'', C-6''), 133.2 (s, C-1'), 133.7 (s, C-1'), 147.5 (s, C-3'), 149.1 (s, C-4'), 158.1 (s, C-4''); *p*-bromobenzoate substituents: 128.2 (2 s), 129.3 (2 s), 131.2 (4 d), 131.7 (4 d), 165.4 (2 s) ppm. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{Br}_2\text{O}_7\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 761.0725; found 761.0761.

Compound 3: Amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -10$ ($c = 0.13$, MeOH). UV (MeOH): λ_{max} [$\log(\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$] = 222 [4.2], 284 nm [3.6]. IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3291, 1512, 1432, 1364, 1271, 1232, 1078, 1033, 815$ cm^{-1} . ^1H

NMR ($\text{CD}_3\text{OD}, 300$ MHz): $\delta_{\text{H}} = 1.59$ –1.72 (m, 4 H, 4-H₂, 6-H₂), 1.75 (m, 1 H, 2a-H), 1.94 (m, 1 H, 2b-H), 2.51–2.61 (m, 3 H, 7a-H, 1-H₂), 2.67 (m, 1 H, 7b-H), 3.20 (t, $J = 8.5$ Hz, 1 H, Glc-2), 3.30 (m, 1 H, Glc-5), 3.33 (m, 1 H, Glc-4), 3.36 (m, 1 H, Glc-3), 3.71 (dd, $J = 11.8, 5.5$ Hz, 1 H, Glc-6a), 3.74 (s, 3 H, 4'-OMe), 3.89 (dd, $J = 11.8, 2.7$ Hz, 1 H, Glc-6b), 3.90 (m, 1 H, 5-H), 3.96 (m, 1 H, 3-H), 4.39 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, Glc-1), 6.52 (dd, $J = 8, 2$ Hz, 1 H, 6'-H), 6.66 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, 5'-H), 6.71 (d, $J = 2$ Hz, 1 H, 2'-H), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 2''-H, 6''-H) ppm. ^{13}C NMR, see Table 2. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_{10}\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 531.2206; found 531.2285.

Acid Hydrolysis of 3: Compound **3** (30 mg) was hydrolyzed by the same procedure as described for **1** to yield **3a** (22 mg). SFC analysis of the sugar fraction under the same conditions as in the case of **1** showed the presence of D-glucose.

Compound 3a: Amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -10$ ($c = 0.1$, MeOH). UV (MeOH): λ_{max} [$\log(\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$] = 222 [4.2], 284 nm [3.6]. IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3340, 1513, 1246, 824, 797$ cm^{-1} . ^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}, 500$ MHz): $\delta_{\text{H}} = 1.54$ (t, $J = 6.2$ Hz, 2 H, 4-H₂), 1.68 (m, 4 H, 2-H₂, 6-H₂), 2.46–2.71 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.74 (s, 3 H, 4'-OMe), 3.80 (m, 2 H, 3-H, 5-H), 6.50 (dd, $J = 8.5, 2$ Hz, 1 H, 6'-H), 6.63 (d, $J = 2$ Hz, 1 H, 2'-H), 6.66 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, 5'-H), 6.80 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H), 7.09 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 2''-H, 6''-H) ppm. ^{13}C NMR, see Table 2. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 369.1678; found 369.1678.

Methylation of 3a: Compound **3a** (7 mg) was methylated by the same procedure as described for **2** to yield **2b** (4 mg).

Compound 4: Amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -3.7$ ($c = 0.1$, MeOH). UV (MeOH): λ_{max} [$\log(\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$] = 227 [3.6], 281 nm [3.5]. IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 1634, 1512, 1244, 1078, 710, 2155, 3220$ cm^{-1} . ^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}, 300$ MHz): $\delta_{\text{H}} = 1.57$ –1.81 (m, 5 H, 4-H₂, 6-H₂, 2a-H), 1.93 (m, 1 H, 2b-H), 2.46–2.67 (m, 4 H, 7-H₂, 1-H₂), 3.20 (t, $J = 8.5$ Hz, 1 H, Glc-2), 3.28 (m, 1 H, Glc-5), 3.33 (m, 1 H, Glc-4), 3.37 (m, 1 H, Glc-3), 3.71 (dd, $J = 11.8, 5.5$ Hz, 1 H, Glc-6a), 3.89 (dd, $J = 11.8, 2.7$ Hz, 1 H, Glc-6b), 3.93 (m, 1 H, 5-H), 3.96 (m, 1 H, 3-H), 4.39 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, Glc-1), 6.50 (dd, $J = 8, 2$ Hz, 1 H, 6'-H), 6.53 (dd, $J = 8, 2$ Hz, 1 H, 6'-H), 6.63 (d, $J = 2$ Hz, 1 H, 2''-H), 6.66 (d, $J = 8$ Hz, 2 H, 5'-H, 5''-H), 6.70 (d, $J = 2$ Hz, 1 H, 2'-H) ppm. ^{13}C NMR, see Table 3. HRMS (ESI): [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_{11}\text{Na}$ 533.1999; found 533.2015.

Acid Hydrolysis of 4: Compound **4** (27 mg) was hydrolyzed by the same procedure as described for **1** to yield **4a** (15 mg). SFC analysis of the sugar fraction under the same conditions as in the case of **1** showed the presence of D-glucose.

Compound 4a: Amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -10$ ($c = 0.1$, MeOH). UV (MeOH): λ_{max} [$\log(\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$] = 221 [4.0], 283 nm [3.7]. IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3440, 1519, 1370, 1058, 815, 782$ cm^{-1} . ^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}, 500$ MHz): $\delta_{\text{H}} = 1.53$ (t, $J = 6.2$ Hz, 2 H, 4-H₂), 1.67 (m, 4 H, 2-H₂, 6-H₂), 2.46–2.64 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.80 (m, 2 H, 3-H, 5-H), 6.51 (dd, $J = 8.5, 2$ Hz, 2 H, 6'-H, 6''-H), 6.63 (d, $J = 2$ Hz, 2 H, 2'-H, 2''-H), 6.66 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, 5'-H, 5''-H) ppm. ^{13}C NMR, see Table 3. HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_6$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 349.1651; found 349.1653.

Methylation of 4a: Compound **4a** (11 mg) was methylated by the same procedure as described for **2** to yield **4b** (5 mg).

Compound 4b: Amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -20$ ($c = 0.1$, MeOH). UV (MeOH): λ_{max} [$\log(\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$] = 228 [5.0], 279 nm [4.6]. IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3280, 1600, 1580, 1420, 1145, 1020, 803, 787, 765$ cm^{-1} . ^1H NMR ($\text{CDCl}_3, 500$ MHz): $\delta_{\text{H}} = 1.65$ (t, $J = 5.7$ Hz, 2 H, 4-H₂), 1.70–1.86

Table 3. ¹³C NMR data for compounds **4**, **4a**, **4b**, and **5–8**.^[a]

C atom	4	4a	4b	5	6	7	8
1	31.8	32.5	32.0	31.6	31.9	31.6	31.7
2	39.1	41.4	39.5	39.2	39.2	38.8	38.9
3	78.4	68.9	69.2	78.4	78.4	77.1	77.2
4	43.0	45.7	42.8	42.0	43.1	40.6	40.7
5	68.5	68.9	69.2	68.4	68.5	73.1	73.3
6	41.3	41.4	39.5	41.2	41.2	38.0	38.1
7	32.5	32.5	32.0	32.5	32.6	31.7	32.0
1'	135.6 ^[b]	135.4	134.6	136.0	135.6	135.4	135.4
2'	116.9	116.7	112.0	130.5	116.9	117.0	116.9
3'	146.1	146.2	149.1	114.8	146.1	146.2	146.3
4'	144.3	144.2	147.5	159.3	144.2	144.3	144.3
5'	116.5	116.4	111.6	114.8	116.4	116.4	116.5
6'	120.9	120.8	120.4	130.5	120.9	121.0	120.8
1''	135.5 ^[b]	135.4	134.6	136.9	136.9	134.9	134.5
2''	116.7	116.7	112.0	116.6	116.7	130.4	116.7
3''	146.2	146.2	149.1	114.8	147.5	115.0	146.1
4''	144.2	144.2	147.5	147.2	147.2	159.6	144.5
5''	116.4	116.4	111.6	113.1	113.1	115.0	116.4
6''	120.7	120.8	120.4	120.6	120.7	130.4	121.0
Glc							
1	104.3			104.4	104.3	104.0	104.1
2	75.6			75.6	75.7	75.5	75.6
3	78.3			78.3	78.3	78.3	78.3
4	71.7			71.8	71.8	71.8	71.8
5	78.0			78.0	78.1	78.0	78.0
6	62.9			62.9	63.0	62.9	62.9
3'-OMe			56.0				
4'-OMe			56.1	56.6	56.7		
3''-OMe			56.0				
4''-OMe			56.1	55.7		55.8	
5-CHO						163.5	163.5

[a] Spectra recorded in CD₃OD (**4–8**, **4a**) or CDCl₃ (**4b**) at 75 (**4**) and 125 MHz (**5–8**, **4a**, **4b**). [b] Assignments may be interchanged.

(m, 4 H, 2-H₂, 6-H₂), 2.54–2.74 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.83 (s, 2 × 3 H, 4'-OMe, 4''-OMe), 3.85 (s, 2 × 3 H, 3'-OMe, 3''-OMe), 3.98 (m, 2 H, 3-H, 5-H), 6.70 (d, *J* = 2 Hz, 2 H, 2'-H, 2''-H), 6.71 (dd, *J* = 8.5, 2 Hz, 2 H, 6'-H, 6''-H), 6.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, 5'-H, 5''-H) ppm. ¹³C NMR, see Table 3. HRMS (ESI): calcd. for C₂₃H₃₂O₆Na [M + Na]⁺ 427.2097; found 427.2084.

Bis[*p*-(dimethylamino)benzoate] (4c**) of **4b**:** NEt₃ (10 μL) was added dropwise to a solution of **4b** (4 mg) in anhydrous CH₂Cl₂ (0.6 mL) containing DMAP (15 mg) as catalyst and *p*-(dimethylamino)benzoyl chloride (10 mg), and the mixture was stirred at 60 °C for 9 h. The reaction mixture was diluted with H₂O (20 mL) and extracted with EtOAc (3 × 10 mL). After concentration of the organic phase, it was purified by chromatography on silica gel eluting with CH₂Cl₂/MeOH (9.5:0.5) to yield **4c** (2 mg).

Compound 4c: Amorphous solid. [*a*]_D²⁵ = +30 (*c* = 0.07, EtOH). UV (EtOH): λ_{max} [log(ε/M⁻¹cm⁻¹)] = 229 [4.4], 311 nm [4.7]. CD (EtOH): λ_{max} (Δε) = 319.8 (+24.5), 296 nm (−22.1 M⁻¹cm⁻¹). IR: ν_{max} = 2989, 1702, 1435, 1020, 803, 787, 765 cm⁻¹. NMR spectroscopic data: see ref.^[10]. HRMS (ESI): calcd. for C₄₁H₅₄N₃O₈ [M + NH₄]⁺ 716.3911; found 716.3916.

Compound 5: Amorphous solid. [*a*]_D²⁵ = −6 (*c* = 0.05, MeOH). UV (MeOH): λ_{max} [log(ε/M⁻¹cm⁻¹)] = 223 [4.7], 278 nm [3.25]. IR: ν_{max} = 3291, 1512, 1432, 1364, 1271, 1232, 1078, 1033, 815 cm⁻¹. ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ_H = 1.60–1.77 (m, 4 H, 4-H₂, 6-H₂), 1.79 (m, 1 H, 2a-H), 1.94 (m, 1 H, 2b-H), 2.51 (m, 1 H, 7a-H), 2.62 (m, 1 H, 7b-H), 2.64 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H, 1-H₂), 3.19 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Glc-2), 3.26 (m, 1 H, Glc-5), 3.33 (m, 1 H, Glc-4), 3.35 (m, 1 H, Glc-3), 3.71 (dd, *J* = 11.8, 5.5 Hz, 1 H, Glc-6a), 3.74 (s, 3 H, 4'-OMe), 3.80 (s, 3 H, 4''-OMe), 3.87 (dd, *J* = 11.8, 2.7 Hz,

1 H, Glc-6b), 3.90 (m, 1 H, 5-H), 3.95 (m, 1 H, 3-H), 4.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Glc-1), 6.62 (dd, *J* = 8.5, 2 Hz, 1 H, 6''-H), 6.66 (d, *J* = 2 Hz, 1 H, 2''-H), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, 5''-H), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H), 7.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, 2'-H, 6'-H) ppm. ¹³C NMR, see Table 3. HRMS (ESI): calcd. for C₂₇H₃₈O₁₀Na [M + Na]⁺ 545.2363; found 545.2404.

Compound 6: Amorphous solid. [*a*]_D²⁵ = −16 (*c* = 0.016, MeOH). UV (MeOH): λ_{max} [log(ε/M⁻¹cm⁻¹)] = 221 [4.1], 282 nm [3.7]. IR: ν_{max} = 3291, 1512, 1432, 1364, 1271, 1232, 1078, 1033, 815 cm⁻¹. ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ_H = 1.60–1.72 (m, 4 H, 4-H₂, 6-H₂), 1.74 (m, 1 H, 2a-H), 1.93 (m, 1 H, 2b-H), 2.48–2.66 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.19 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Glc-2), 3.28 (m, 1 H, Glc-5), 3.33 (m, 1 H, Glc-4), 3.37 (m, 1 H, Glc-3), 3.71 (dd, *J* = 11.8, 5.5 Hz, 1 H, Glc-6a), 3.81 (s, 3 H, 4'-OMe), 3.89 (dd, *J* = 11.8, 2.7 Hz, 1 H, Glc-6b), 3.90 (m, 1 H, 5-H), 3.95 (m, 1 H, 3-H), 4.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Glc-1), 6.53 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1 H, 6'-H), 6.61 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1 H, 6''-H), 6.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, 5'-H), 6.66 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, 2''-H), 6.69 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, 2'-H), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, 5''-H) ppm. ¹³C NMR, see Table 3. HRMS (ESI): calcd. for C₂₆H₃₆O₁₁Na [M + Na]⁺ 547.2155; found 547.2166.

Compound 7: Amorphous solid. [*a*]_D²⁵ = −10 (*c* = 0.032, MeOH). UV (MeOH): λ_{max} [log(ε/M⁻¹cm⁻¹)] = 223 [4.1], 279 nm [3.6]. IR: ν_{max} = 3291, 1512, 1432, 1364, 1271, 1232, 1078, 1033, 815 cm⁻¹. ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ_H = 1.75 (m, 1 H, 2a-H), 1.80–1.95 (m, 5 H, 4-H₂, 6-H₂, 2b-H), 2.49–2.60 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.20 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Glc-2), 3.23 (m, 1 H, Glc-5), 3.32 (m, 1 H, Glc-4), 3.34 (m, 1 H, Glc-3), 3.71 (dd, *J* = 11.8, 5.5 Hz, 1 H, Glc-6a), 3.74 (m, 1 H, 3-H), 3.75 (s, 3 H, 4''-OMe), 3.87 (dd, *J* = 11.8, 2.7 Hz, 1 H, Glc-6b), 4.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Glc-1), 5.19 (m, 1 H, 5-H), 6.52 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1 H, 6'-H), 6.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, 5'-H), 6.70 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, 2'-H), 6.82 (d, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.06 (d, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 2 H, 2''-H, 6''-H), 8.12 (s, 1 H, CHO-5) ppm. ¹³C NMR, see Table 3. HRMS (ESI): calcd. for C₂₇H₃₆O₁₁Na [M + Na]⁺ 559.2255; found 559.2241.

Compound 8: Amorphous solid. [*a*]_D²⁵ = −61 (*c* = 0.024, MeOH). UV (MeOH): λ_{max} [log(ε/M⁻¹cm⁻¹)] = 222 [3.9], 281 nm [3.6]. IR: ν_{max} = 3409, 1660, 1069 cm⁻¹. ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ_H = 1.75 (m, 1 H, 2a-H), 1.80–1.95 (m, 5 H, 4-H₂, 6-H₂, 2b-H), 2.49–2.60 (m, 4 H, 1-H₂, 7-H₂), 3.18 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H, Glc-2), 3.23 (m, 1 H, Glc-5), 3.32 (m, 1 H, Glc-4), 3.34 (m, 1 H, Glc-3), 3.71 (dd, *J* = 11.8, 5.5 Hz, 1 H, Glc-6a), 3.72 (m, 1 H, 3-H), 3.87 (dd, *J* = 11.8, 2.7 Hz, 1 H, Glc-6b), 4.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Glc-1), 5.19 (m, 1 H, 5-H), 6.47 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1 H, 6''-H), 6.52 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1 H, 6'-H), 6.60 (d, *J* = 2.0 Hz, 2''-H), 6.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, 5'-H), 6.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, 5''-H), 6.70 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, 2'-H), 8.12 (s, 1 H, CHO-5) ppm. ¹³C NMR, see Table 3. HRMS (ESI): calcd. for C₂₆H₃₄O₁₂Na [M + Na]⁺ 561.1948; found 561.2037.

Antiplasmodial Evaluation: The chloroquine-resistant strain FcB1/Colombia of *Plasmodium falciparum* was maintained in vitro on human erythrocytes in RPMI 1640 medium supplemented by 8% (v/v) heat-inactivated human serum at 37 °C under an atmosphere of 3% CO₂, 6% O₂, and 91% N₂. In vitro drug susceptibility was measured by [³H]hypoxanthine incorporation as described previously.^[15] Stock solutions of drugs were prepared in DMSO. Compounds were serially diluted two-fold with 100 μL culture medium in 96-well plates. Asynchronous parasite cultures (100 μL, 1% parasitemia and 1% final haematocrit) were then added to each well, which were incubated for 24 h at 37 °C prior to the addition of 0.5 μCi of [³H]hypoxanthine (GE Healthcare, 1–5 Ci mmol⁻¹)

per well. After further incubation for 24 h, the plates were frozen and thawed. Cell lysates were then collected on glass-fiber filters and counted in a liquid scintillation spectrometer. The growth inhibition at each drug concentration was determined by comparison of the radioactivity incorporated in the treated culture with that in the control culture maintained on the same plate. The concentration causing 50% growth inhibition (IC₅₀) was determined from the drug concentration–response curve and the results are expressed as the mean values ± standard deviations determined from three independent experiments. Chloroquine diphosphate, used as a positive control, was purchased from Sigma (purity >99%).

Antileishmanial Evaluation: Promastigote forms of the *Leishmania donovani* (MHOM/ET/67/HU3) line, called LV9, were grown in M-199 medium (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% inactivated foetal calf serum (Invitrogen, Eragny, France), 40 mM HEPES (VWR, Paisley, Scotland), 100 μM adenosine (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), and 0.5 mg L⁻¹ Hemin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) in the presence of 50 μg mL⁻¹ gentamicin at 26 °C in 5% CO₂. Peritoneal macrophages were harvested from female CD1 mice (Charles River, Cléon, France) three days after an intraperitoneal injection of 1.5 mL of sodium thioglycolate (Biomérieux) and were dispensed into eight-well chamber slides (LabTek Ltd.) at a density of 5 × 10⁴ per well (400 μL per well) in RPMI 1640 medium supplemented with 10% hi-FCS, 25 mM HEPES, and 2 mM L-glutamine (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Four hours after the macrophages were plated, they were washed to eliminate fibroblasts. After a 24 h incubation period, the macrophages were infected with promastigote forms of *L. donovani* LV9 in a stationary phase in a ratio of 10 parasites per macrophage to obtain 87% of infected macrophages and 10 ± 3 amastigotes per macrophage. After 18 h the free promastigotes were eliminated and intramacrophagic amastigotes were treated with various concentrations of the compounds. Pentamidine and amphotericin B were used as reference compounds. The culture medium was renewed 48 h later and a new culture medium containing the drug was added. The experiment was stopped after five days and the percentages of infected macrophages were evaluated microscopically after Giemsa staining. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) were determined by linear regression analysis and expressed in μM ± standard errors. Each experiment was performed in triplicate.

Antitrypanosomal Evaluation: The method used has been described previously by Loiseau et al.^[16] Briefly, the bloodstream forms of *T. brucei brucei* were maintained in vitro for 24 h in the dark at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere in a minimum essential medium (Gibco BRL) that includes 25 mM HEPES and Earle's salts and is supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 g L⁻¹ of additional glucose, 10 mL⁻¹ of minimum essential medium nonessential amino acids (100×, Gibco BRL), 0.2 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM sodium pyruvate, 0.1 mM hypoxanthine, 0.016 mM thymidine, 15% heat-inactivated horse serum (Gibco BRL), and 50 μg mL⁻¹ of gentamycin. The drug evaluation was carried out in 96-well tissue culture plates in a final volume of 200 μL containing 2 × 10⁵ trypomastigotes previously purified by centrifugation from the blood of an infected mouse, collected aseptically from the retro-orbital sinus and the compounds to be tested. Pentamidine was used as reference compound. The minimum effective concentration (MEC) was defined as the minimum concentration at which no viable parasite was observed microscopically. This value was confirmed by injecting intraperitoneally the culture from the well corresponding to the MEC

into a mouse to confirm that the non-motile parasites were really killed and not able to divide.

Cytotoxicity Evaluation: The human KB tumor cell line (mouth epidermoid carcinoma) was originally obtained from ATCC. The human diploid embryonic lung cells MRC-5 were obtained from ECACC. The human promyelocytic leukemia cells HL-60 were obtained from ICSN. They were seeded into 96-well microplates at 2000 cells per well. The cytotoxicity assays were performed according to a published procedure.^[17] Taxotere (in-house product, purity >99%) was used as a reference compound.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. D. Crich for the grant accorded to this project (M. A. B.). We express our thanks to G. Aubert, who performed the cytotoxic assays. We also thank Dr. Elisabeth Mouray from the National Museum of Natural History for his help with the antiplasmodial assays.

- [1] R. W. Snow, C. A. Guerra, A. M. Noor, H. Y. Myint, S. I. Hay, *Nature* **2005**, *434*, 214–217.
- [2] *Antimalarial drug combination therapy*, report of the World Health Organization (WHO) technical consultation (Ed.: M. Geyer), WHO, Geneva, **2001**.
- [3] N. J. White, *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1956–1957.
- [4] A. M. Dondorp, F. Nosten, P. Yi, D. Das, A. P. Phylo, J. Tarning, K. M. Lwin, F. Ariey, W. Hanpithakpong, S. J. Lee, P. Ringwald, K. Silamut, M. Imwong, K. Chotivanich, P. Lim, T. Herdman, S. S. An, S. Yeung, P. Singhasivanon, N. P. J. Day, N. Lindegardh, D. Socheat, N. J. White, *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 455–467.
- [5] A. Yokosuka, Y. Mimaki, H. Sakagami, Y. Sashida, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 283–289.
- [6] C. Per, U. P. Claeson, P. Tuchinda, V. Reutrakul, in: *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 26, part 7 (Ed.: Atta ur Rahman), Elsevier, Amsterdam, **2002**, pp. 881–908.
- [7] P. Anand, S. Thomas, A. Kunnumakkara, C. Sundaram, K. Harikumar, B. Sung, S. Tharakan, K. Misra, I. Priyadarsini, K. Rajasekharan, *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1590–1611.
- [8] N. Harada, K. Nakanishi, *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 257–263.
- [9] N. Harada, A. Saito, H. Ono, J. Gawronski, K. Gawronska, T. Sugioka, H. Uda, T. Kuriki, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3842–3850.
- [10] S.-I. Uehara, K. Akiyama, H. Morita, K. Takeya, H. Itokawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 3298.
- [11] H. Yagi, H. Akagi, D. R. Thakker, H. D. Mah, M. Koreeda, D. M. Jerina, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2358–2359.
- [12] J. Ishida, H. Ohtsu, Y. Tachibana, Y. Nakanishi, K. F. Bastow, M. Nagai, H.-K. Wang, H. Itokawa, K.-H. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3481–3487.
- [13] H. L. Ziegler, D. Staerk, J. Christensen, L. Hviid, H. Hagerstrand, J. W. Jaroszewski, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1441–1446.
- [14] Y. H. T. Bruhn, A. Schaumlöffel, G. Bringmann, *SpecDis*, version 1.51, University of Würzburg, Germany, **2011**.
- [15] J. Guillon, P. Grellier, M. Labaied, P. Sonnet, J.-M. Léger, R. Déprez-Poulain, I. Forfar-Bares, P. Dallemagne, N. Lemaitre, F. Péhourcq, J. Rochette, C. Sergheraert, C. Jarry, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1997–2009.
- [16] P. M. Loiseau, P. Lubert, J.-G. Wolf, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 2954–2961.
- [17] C. Tempête, G. H. Werner, F. Favre, A. Rojas, N. Langlois, *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 647–650.

Received: September 27, 2011

Published Online: December 13, 2011

Goniomedines A and B: Unprecedented Bisindole Alkaloids Formed through Fusion of Two Indole Moieties via a Dihydropyran Unit

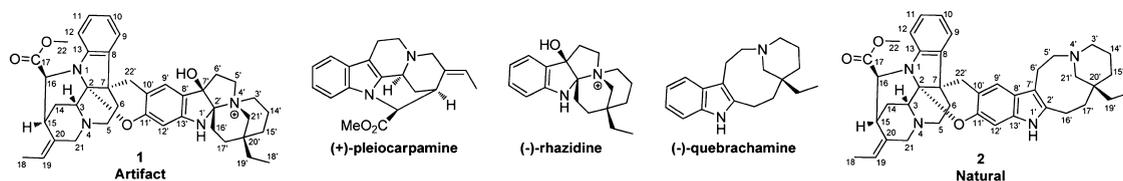
Mehdi A. Beniddir,[†] Marie-Thérèse Martin,[†] Marie-Elise Tran Huu Dau,[†]
Philippe Grellier,[‡] Philippe Rasoanaivo,[§] Françoise Guéritte,[†] and Marc Litaudon^{*,†}

Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, LabEx LERMIT, 1, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7245 CNRS, Team APE, CP 52, 61, Rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France, and Institut Malgache de Recherches Appliquées, B. P. 3833, 102 Antananarivo, Madagascar

marc.litaudon@icsn.cnrs-gif.fr

Received July 4, 2012

ABSTRACT



Two novel bisindole alkaloids, goniomedines A (1) and B (2), possessing an unprecedented quebrachamine–pleiocarpamine-type skeleton, in which indole moieties are fused via a dihydropyran unit, were isolated from the stem bark of *Gonioma malagasy*. The structures were elucidated by comprehensive analysis of MS and NMR spectroscopic data. Their absolute configurations were deduced following the comparison of experimental and theoretically calculated ECD spectra and through biogenetic considerations. Goniomedine B (2) exhibited moderate activity against *Plasmodium falciparum*.

In continuation of our efforts to identify new antiprotozoal compounds from tropical plants,¹ we investigated chemically the stem bark of *Gonioma malagasy* Mgf and P.Bt² (Apocynaceae), a tree collected in the forest of Toliara in the southwest of Madagascar. The genus *Gonioma* comprises only two species, the second one, *G. kamassi*, being limited to South Africa.³ Previous phytochemical investigations of *G. malagasy* led to the isolation of three structurally interesting compounds such as pleiomutinine,⁴

goniimine,⁵ and goniomitine.⁶ The latter possesses a unique ring system in natural products. Herein, we report the isolation and structure elucidation of goniomedines A (1) and B (2), representing the first example of an unprecedented class of quebrachamine–pleiocarpamine bisindole alkaloids.

Air-dried and powdered stem bark of *G. malagasy* afforded a mixture of alkaloids using a traditional solid–liquid extraction procedure. The alkaloidic extract, which exhibited a significant antiplasmodial activity (100% at 10 $\mu\text{g/mL}$) with no cytotoxicity, was subjected to repeated chromatography to give goniomedine A (1)⁷ as the major constituent (0.04% w/w). The UV spectrum

[†] Institut de Chimie des Substances Naturelles.

[‡] Muséum National d'Histoire Naturelle.

[§] Institut Malgache de Recherches Appliquées.

(1) Beniddir, M. A.; Grellier, P.; Rasoanaivo, P.; Loiseau, P. M.; Bories, C.; Dumontet, V.; Guéritte, F.; Litaudon, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 1039–1046.

(2) Markgraf, F.; Boiteau, P. *Adansonia* **1972**, 12, 223–229.

(3) Kaschnitz, R.; Spitteller, G. *Monatsh. Chem.* **1965**, 96, 909–921.

(4) Rasoanaivo, P.; Lukacs, G. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 376–378.

(5) Chiaroni, A.; Randriambola, L.; Riche, C.; Husson, H. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5920–5921.

(6) Randriambola, L.; Quirion, J. C.; Kan-Fan, C.; Husson, H. P. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2123–2126.

(7) Goniomedine A (1): red amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 114$ (c 0.1, MeOH); IR ν_{max} 3400, 1750, 1130; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 209 (4.56) 254 (3.5) 296 (3.80) nm; ¹H and ¹³C NMR data: see table 1; HRESIMS (pos) m/z 649.3756 [M]⁺ (calcd for C₄₀H₄₉N₄O₄, 649.3754).

was characteristic of a dihydroindole chromophore with absorption maxima at 254 and 296 nm. The IR spectrum of **1** showed absorption bands at ν_{\max} 3400, for OH and NH elongation, and at 1750 cm^{-1} , for an aliphatic ester. The HR-ESIMS of **1** showed a $[M]^+$ ion peak at m/z 649.3756 suggesting a molecular formula of $C_{40}H_{49}N_4O_4$ (corresponding to a DBE value of 19). The ^1H and ^{13}C NMR data (Table 1), and HSQC spectrum suggested the presence of five sp^3 quaternary carbons, 13 sp^3 methylenes, three sp^3 methines, three methyls, seven sp^2 methines, and eight sp^2 quaternary carbons.

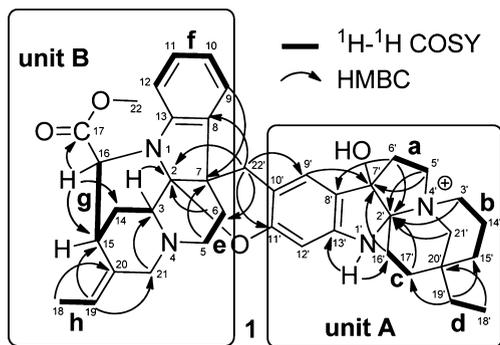


Figure 1. Selected 2D NMR correlations for goniomedine A (**1**).

The planar structure of **1** was deduced from extensive analysis of the two-dimensional NMR data, including the ^1H – ^1H COSY, HSQC, TOCSY, and HMBC spectra in $\text{DMF-}d_7$. The ^1H – ^1H COSY and HSQC revealed connectivities of eight partial structures (a–h) as shown in Figure 1. These partial structures were classified into two units A and B.

In unit A, the connectivity of partial structure **a** and dihydroindole ring (C-2', C-7'–C-13' and N-1') was revealed by the HMBC correlations from H_2 -5' to C-7' and C-2', and from H_2 -6' to C-2', whereas HMBC correlations from H_2 -21' to C-2', C-5', C-15', C-17', and C-20' established the connections between partial structures **a**, **b**, and **c**. In addition, cross peak from H_3 -18' to C-20' indicated that the ethyl group **d** is attached at C-20', and from H-3' to C-2' suggested the linkage between C-3' and C-2' through a nitrogen atom, resulting in a pyrrole ring formation. The ^1H and ^{13}C NMR signals of the unit A were consistent with a rhazidine moiety,⁸ a quebrachamine-type alkaloid that was previously isolated from *G. kamassi*.⁹

In unit B, the presence of a dihydroindole ring (C-2, C-7–C-13) was established by HMBC correlations from H_2 -6 to C-2 and from H-9 to C-7, whereas the connectivity of C-2 and C-3 was deduced from correlation for H-3 to C-2. The presence of an ethylidene group at C-20 was indicated by HMBC correlations from H_3 -18 to C-20, and

from H-19 to C-15 and C-21. In the ^1H NMR spectrum of **1**, a well resolved methine doublet at δ_{H} 4.66 ($J = 3.8\text{ Hz}$) is reminiscent of the H-16 signal of pleiocarpamine and of bisindoles incorporating pleiocarpamine unit.¹⁰ The downfield shift of C-2 indicated that it is linked to both a nitrogen and an oxygen atom, while the chemical shift of C-7 suggested connection to a carbon atom. The bridging of C-2 by an oxygen and C-7 by a carbon atom is common and can be exemplified by the bisindoles villalstonine¹¹ and pleiocorine.¹²

Rhazidine and pleiocarpamine units accounted for 18 DBE, and the remaining degree of unsaturation required the presence of an additional ring in goniomedine A (**1**). A close examination of **1** and 2D NMR spectra led to identify signals at $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ (25.7/3.53 and 3.49) for an additional methylene group (CH_2 -22'). HMBC correlations from H_2 -22' to C-2, C-6, C-8, C-9' and C-11' suggested that this methylene group belongs to a dihydropyran ring formed by one oxygen atom and C-2, C-7, C-10', C-11', and C-22' and that this ring is fused to two monomers. The gross structure of **1** was assigned to be a new bisindole alkaloid possessing an unprecedented linkage between the two dihydroindole moieties. The relative stereochemistry of each monoterpeneindole unit was assigned by ROESY correlations as shown in Figure 2.

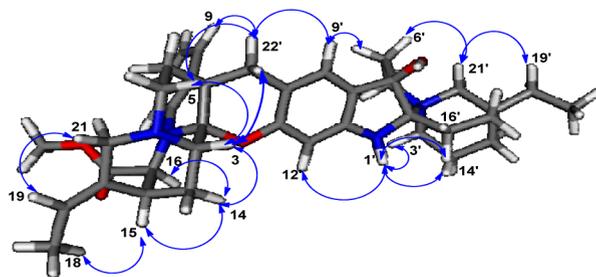


Figure 2. Key ROESY correlations of **1a**.

In the dihydropleiocarpamine unit (left part of the molecule), correlations H-3/H-5a, H-14a and H-22', and H-14a/H-15 and H-16 indicated that they were all cofacial, while the correlation H-19/H-21 and H_3 -18/H-15 established the *E*-configuration of the ethylidene side chain. The relative stereochemistry of this unit was consequently assigned as $2R^*$, $3S^*$, $7S^*$, $15S^*$, $16S^*$. In the rhazidine unit (right part of the molecule), correlations H-21'/H-6' and H-19' suggested that they were all cofacial and randomly assigned as β oriented. The strong intensity of correlations between NH-1' and H-3', H-14', and H-16' indicated that they were α oriented. Thus, the relative configuration of this unit was established as $2'S^*$, $4'S^*$, $7'R^*$, $20'R^*$. Because of the large distance between the two alkaloidic monomers,

(10) Kam, T.-S.; Tan, S.-J.; Ng, S.-W.; Komiyama, K. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3749–3752.

(11) Nordman, C. E.; Kumra, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2059–2060.

(12) Das, B. C.; Cosson, J. P.; Lukacs, G.; Potier, P. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 4299–4302.

(8) Éles, J.; Kalasz, G.; Szabó, L.; Lévai, A.; Greiner, I.; Kajtár-Peredy, M.; Szabó, P.; Szántay, C. *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, *39*, 767–771.

(9) Markey, S.; Biemann, K.; Witkop, B. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 157–160.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Data of **1** and **2** (in DMF- d_7)

position	1		2	
	δ_{H} (mult, J , Hz) ^a	δ_{C} ^b	δ_{H} (mult, J , Hz) ^a	δ_{C} ^b
2		93.3		94.3
3	4.15 (1H, br s)	50.4	4.32 (1H, br s)	51.6
5	3.38 (1H, br d, 13); 3.86 (1H, m)	46.2	3.39 (1H, m); 3.91 (1H, m)	47.0
6	2.22 (2H, m)	30.7	2.24 (2H, m)	31.5
7		43.1		44.6
8		134.3		135.4
9	7.33 (1H, d, 7.2)	121.9	7.23 (1H, d, 7.2)	123.0
10	6.84 (1H, dd, 7.2, 7.8)	120.6	6.72 (1H, dd, 7.2, 7.6)	121.2
11	7.10 (1H, t, 7.8)	127.8	7.01 (1H, dd, 7.6, 7.9)	128.4
12	6.42 (1H, d, 7.8)	110.8	6.37 (1H, d, 7.9)	111.5
13		145.5		146.6
14	2.14 (1H, m); 2.93 (1H, m)	24.9	2.12 (1H, br d, 13.9); 3.00 (1H, br d, 13.9)	25.8
15	3.59 (1H, m)	30.2	3.61 (1H, m)	31.3
16	4.66 (1H, d, 3.8)	57.1	4.75 (1H, d, 3.5)	58.1
17		169.6		170.7
18	1.65 (3H, dd, 6.7, 1.9)	11.9	1.65 (3H, dd, 6.7, 1.6)	12.9
19	5.65 (1H, qd, 6.7, 1.9)	124.2	5.64 (1H, q, 6.7)	125.1
20		130.2		131.4
21	4.74 (1H, br d, 13.4); 3.82 (1H, m)	52.0	3.81 (1H, m); 4.76 (1H, m)	52.8
22	3.83 (3H, s)	52.2	3.82 (3H, s)	53.2
2'		100.8		139.0
3'	3.44 (1H, td, 13.5, 5.1); 3.65 (1H, dd, 13.5, 4.0)	56.2	3.33 (1H, m)	56.32
4'			6.48 (1H, m)	
5'	3.31 (1H, m); 3.59 (1H, m)	60.3	3.08 (1H, m); 3.40 (1H, m)	52.5
6'	2.41 (1H, m); 2.91 (1H, m)	37.8	3.24 (1H, dd, 15, 3.5); 3.55 (1H, m)	19.8
7'		88.9		102.9
8'		125.0		125.1
9'	7.12 (1H, s)	124.0	7.31 (1H, s)	118.0
10'		110.6		113.1
11'		154.6		150.8
12'	6.05 (1H, s)	96.7	6.58 (1H, s)	97.2
13'		146.3		136.0
14'	1.84 (1H, m); 2.46 (1H, m)	19.2	1.76 (1H, d, 14.6); 2.31 (1H, m)	20.7
15'	1.55 (1H, td, 13.2, 6.3); 1.74 (1H, m)	30.3	1.45 (1H, m); 1.59 (1H, td, 13, 4.5)	31.1
16'	2.17 (1H, m); 2.47 (1H, m)	28.3	2.88 (2H, m)	20.8
17'	1.73 (2H, m)	30.0	1.94 (2H, m)	32.0
18'	0.86 (3H, t, 7.6)	6.4	0.87 (3H, t, 7.4)	7.7
19'	1.31 (2H, q, 7.6)	33.9	1.36 (1H, m); 1.47 (1H, m)	30.6
20'		31.6		38.1
21'	3.29 (1H, d, 12); 3.69 (1H, d, 12)	61.9	2.89 (1H, m); 4.46 (1H, d, 12.5)	56.38
22'	3.49 (1H, d, 17.2); 3.53 (1H, d, 17.2)	25.7	3.58 (1H, d, 16.5); 3.76 (1H, d, 16.5)	27.8
1'NH	7.16 (1H, s)		10.90 (1H, s)	

^aData recorded at 600 MHz. ^bData recorded at 150 MHz.

it was not possible to assign a relative configuration for **1** at that stage.

In order to determine the absolute configuration of **1**, experimental ECD spectrum was compared with that of theoretically calculated ECD curves of the four possible stereoisomers **1a-1d** [formed with (+)- or (-)-rhazidine and (+)- or (-)-pleiocarpamine units] (see the Supporting Information, Figure 3). Although the calculated ECD curves of diastereoisomers **1a** and **1c**, sharing the same stereochemistry for the dihydropleiocarpamine unit, matched well with the experimental CD spectrum, an unambiguous assignment of the absolute configuration of **1** cannot be confirmed.

The synthesis⁸ of (+)-rhazidine by oxidation of (+)-quebrachamine caught our attention on the fact that **1** might be an artifact formed during the alkaloid extraction. This hypothesis was strongly supported since the ethanolic extract of *G. malagasy* stem bark afforded another unknown bisindole alkaloid named goniomedine **B** (**2**), whereas goniomedine **A** (**1**) was absent.

The N4'-protonated form of compound **2**¹³ was isolated as an amorphous powder. The HR-ESIMS of the

(13) Goniomedine **B** (**2**): red amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 62$ (c 0.05, MeOH); IR ν_{max} 3400, 1750, 1130; UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 206 (4.66) 237 (4.4) 293 (4.04) nm; ^1H and ^{13}C NMR data: see table 1; HRESIMS (pos) m/z 633.3813 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_3$, 633.3805).

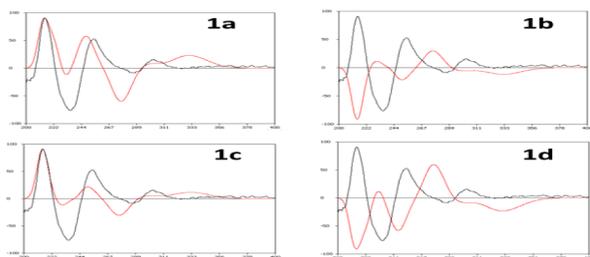
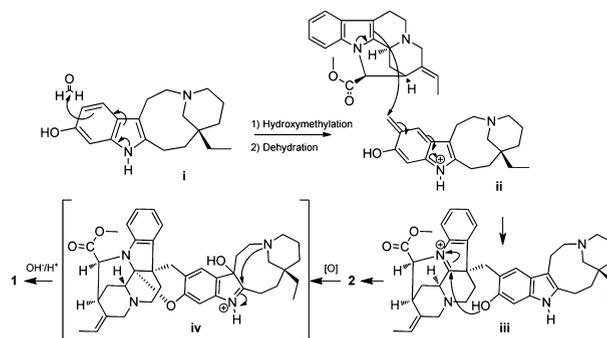


Figure 3. Calculated ECD spectra of **1a–d**: experimental ECD (black); calculated ECD (red).

quasi-molecular positive ion peak $[M]^+$ at m/z 633.3813 established the molecular formula as $C_{40}H_{49}N_4O_3$, indicating a molecular weight of 16 mass units lower than **1**. In its 1H and ^{13}C NMR spectra, signals closely matched those of goniomedine A. The main differences between **1** and **2** was the presence of an additional signal for an exchanged proton at δ_H 6.48 in **2**, which was located on the nitrogen atom N-4' by TOCSY correlations (see S21, Supporting Information), and the replacement of the two sp^3 quaternary carbons by two sp^2 quaternary carbons C-7' and C-2' at δ_C 102.9 and δ_C 139.0, respectively. These observations strongly suggested that compound **2** differed from **1** in that the rhazidine unit was replaced by a quebrachamine unit. A thorough analysis of COSY, HSQC and HMBC data confirmed this assignment. To test the hypothesis that goniomedine A (**1**) might be an artifact formed during the alkaloid-extraction process, goniomedine B (**2**) was subjected to an acid/base treatment at room temperature. Compound **1** was afforded with reasonable yield (20%). The relative stereochemistry of the "quebrachamine" part of **2** was assigned by analysis of ROESY data. The strong correlation between H-4' and H₂-17' implied the *anti* orientation of the ethyl side chain with respect to H-4' (see the Supporting Information), suggesting the relative configuration 4'*R**,20'*R**. Finally, we proposed that the absolute configuration of both **1** and **2** was based on the absolute stereochemistry of the quebrachamine unit of **2**. Indeed, the chemical investigation of the stem bark and leaves alkaloid extracts afforded (+)-pleiocarpamine¹⁴ and (–)-quebrachamine,¹⁵ according to NMR data and $[\alpha]_D$ values. Thus, on the basis of comparison of experimental and theoretically calculated ECD spectra, and through biogenetic considerations, the absolute configuration of goniomedines A (**1**) and B (**2**) can be assigned as 2*R*,3*S*,7*S*,

15*S*,16*S*,2'*S*,4'*S*,7'*R*,20'*R* and 2*R*,3*S*,7*S*,15*S*,16*S*,4'*R*,20'*R*, respectively.

Scheme 1. Plausible Biosynthetic Pathway for **1** and **2**



A possible biogenetic pathway for **1** and **2** is presented in Scheme 1. The sequence is initiated by an hydroxymethylation of (–)-11-hydroxyquebrachamine **i** with formaldehyde (as was the case for pycnanthine¹⁶),¹⁷ whose presence may result from microbial degradation reactions.¹⁸ Then, a conjugate addition of (+)-pleiocarpamine onto the intermediate **ii** should lead to dimer **iii**, which undergoes a nucleophilic attack by the phenolic OH at C-2 to give **2**, which should lead to **1** during extraction, presumably through the intermediate **iv**.⁸

Goniomedine B (**2**) showed moderate antiplasmodial activity toward the chloroquine-resistant strain FcB1 of *P. falciparum*, with IC₅₀ of 2.8 μ M, whereas goniomedine A (**1**) was not active.

Compounds **1** and **2** represent the first example of bisindole alkaloids constituted from the bridging of one (+)-pleiocarpamine and a (–)-rhazidine or a (–)-quebrachamine moiety via a dihydropyrane unit.

Acknowledgment. We are very grateful to Prof. D. Crich (Wayne State University) for the fellowship (M.A.B.). We thank E. Mouray (MNHN) for her help with the antiplasmodial assays and B. Delpech (CNRS) and P.-M. Allard (CNRS) for fruitful discussions concerning the biosynthetic pathway and ECD calculation.

Supporting Information Available. Experimental procedures, computational methods, DFT-optimized geometry, and NMR spectra. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

(17) Although the origin of the methylene involved in such reaction could be artifactual, few examples involving formaldehyde have been reported in the literature.

(18) Dewick, P. M. In *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd ed.; Wiley: Chichester, 2009; pp 163–165.

(14) Akinloye, B. A.; Court, W. E. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 307–311.

(15) Amat, M.; Lozano, O.; Escolano, C.; Molins, E.; Bosch, J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4431–4439.

(16) Gorman, A. A.; Dastoor, N. J.; Hesse, M.; Philipsborn, W. V.; Renner, U.; Schmid, H. *Helv. Chim. Acta* **1969**, *52*, 33–55.

The authors declare no competing financial interest.

Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés à activité antiplasmodiale, deux plantes de Madagascar ont été étudiées : *Pyrostria major* (Rubiaceae) et *Gonioma malagasy* (Apocynaceae). Leurs extraits acétate d'éthyle et alcaloïdique ont montré une activité antiplasmodiale significative vis-à-vis de la souche chloroquino-résistante FcB1 lors d'un criblage préliminaire. L'étude phytochimique des feuilles de *P. major* a conduit à l'isolement du β sitostérol ainsi que de huit nouveaux diarylheptanoïdes glycosylés, décrits pour la première fois dans une plante appartenant à la famille des Rubiaceae. L'activité antiplasmodiale de l'extrait AcOEt des feuilles est probablement due à la présence du β sitostérol. Cette activité serait due à l'effet stomatocytogénique provoqué par cette famille de composés. L'utilisation de l'"Exciton chirality" a permis de déterminer la configuration absolue des diarylheptanoïdes glycosylés isolés. Cette étude structurale nous a permis d'obtenir d'une part, deux composés antiplasmodiaux sélectifs et non cytotoxiques et d'autre part, un composé antileishmanien et un autre antitrypanosomal. L'étude de l'extrait alcaloïdique de *G. malagasy* a conduit à l'isolement d'une nouvelle série chimique, "les goniomedines". Ces dernières sont caractérisées par un squelette bisindolique constitué de deux monomères dihydroindoliques reliés par une unité dihydropyrane. Une étude configurationnelle basée sur le calcul théorique de spectres de dichroïsme circulaire ainsi que sur des considérations biogénétiques, a permis la détermination de leur configuration absolue. Parmi ces composés, un seul a montré une activité antiplasmodiale significative.

◆Mots-clés :

Paludisme, FcB1, *Pyrostria major*, diarylheptanoïde, exciton chirality, dichroïsme circulaire, stomatocytogénèse, *Gonioma malagasy*, bisindoles, goniomedines, modélisation moléculaire.

◆Laboratoire de rattachement

Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS)
1, avenue de la Terrasse
91190 Gif sur Yvette Cedex, France

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex