

# MÉTABOLITES SECONDAIRES ISOLÉS D'UNE CULTURE DE TISSUS DE *CATHARANTHUS ROSEUS*

F. GUÉRITTE, N. LANGLOIS

*Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S.,  
91190—Gif-sur-Yvette (France)*

V. PÉTIARD

*Laboratoire de Génétique Végétale, Synthélabo (L.E.R.S.) B.P. 0166  
37001—Tours Cedex (France)*

**ABSTRACT.**—One strain of *Catharanthus roseus* tissue culture has been studied for its alkaloid content showing an antimetabolic activity. Ajmalicine (1), 3-epiajmalicine (2), tetrahydroalstonine (3), 7-hydroxy-indolenine ajmalicine (4), pseudoindoxyl ajmalicine (5), desacetyluquammiline (7) and 10-hydroxy desacetyl-akuammiline (10) were isolated and identified.

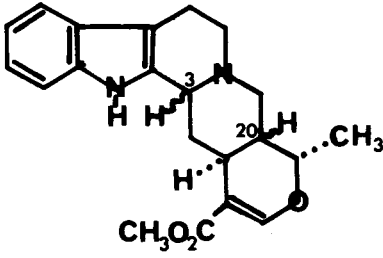
La capacité de biosynthèse de métabolites secondaires des tissus et des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* G. DON (Apocynacées) cultivés *in vitro* est actuellement très étudiée (1-19). En effet, la grande variabilité du potentiel de biosynthèse des souches d'une même espèce est à l'origine de nombreuses recherches. Celles-ci peuvent être orientées vers la production d'un composé déterminé présentant un intérêt économique comme l'ajmalicine (1) (3), ou vers l'identification du(ou des) composants responsables de l'activité biologique présentée par des extraits.

Ainsi, l'une des souches de cultures de tissus de *C. roseus* a été sélectionnée pour l'activité antimetabolique présentée par ses extraits alcaloïdiques (7,20).

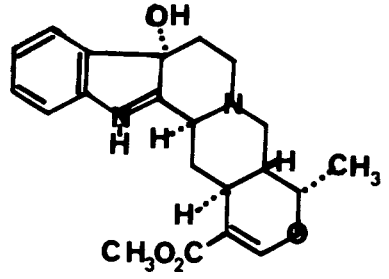
La technique d'extraction a déjà été décrite (7). L'analyse en C.C.M. des extraits obtenus indique la présence d'une cinquantaine de composés, ce qui démontre la richesse du potentiel de biosynthèse de cette souche.

L'extrait brut (1,8 g) a été divisé en 20 fractions par filtration sur colonne de gel de Sephadex LH 20. Les tests *in vitro* effectués sur ces fractions permettent de vérifier que l'activité antimetabolique n'est pas due, comme dans la plante entière, à des composés bis-indoliques de type vinblastine, mais peut être rapportée à la présence de composés de plus faible poids moléculaire. Pour tenter de localiser le(ou les) principes actifs, cinq de ces fractions ont été soumises à plusieurs étapes de séparation chromatographiques (21). Au cours de ces étapes ont été isolés: l'ajmalicine (1), l'épi-3 ajmalicine (2) (22), la tétrahydroalstonine (3) (17,18), l'hydroxy-7 indolénine de l'ajmalicine (4) (23), la pseudoindoxyl-ajmalicine (5) (24), la tabersonine (6) (7) et deux alcaloïdes de structures voisines.

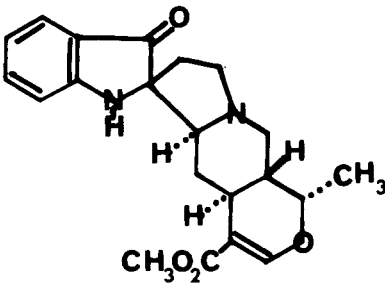
Le plus abondant de ces derniers est identifié à la désacétyluquammiline (7), isolée pour la première fois de *Picralima nitida* Stapf (25), par comparaison directe avec le produit d'hydrolyse de l'akuammiline (8) (25). En rmn du proton à haut champ, les expériences de découplage et la comparaison avec le spectre de la désacétyl-desformoakuammiline (9) (26), permettent d'identifier les signaux de tous les protons de la molécule (tableau 1) et d'en déduire la structure de l'alcaloïde nouveau, isolé en très faible quantité. Ce dernier présente en spectrométrie de masse un pic moléculaire  $M^+$  à  $m/z=368$ . L'examen de son spectre de rmn du proton à 400 MHz indique une étroite parenté structurale avec l'alcaloïde 7 puisque l'on observe, mise à part l'absence d'un des protons aromatiques, une similitude de tous les déplacements chimiques et constantes de couplage. Les couplages des protons aromatiques peuvent s'accorder avec une substitution en  $C_{10}$  ou  $C_{11}$  et ces données indiquent une structure hydroxy-10(ou 11) désacétyluquammiline (10). La présence d'un hydroxyle phénolique est confirmée par le spectre uv de 10 et le déplacement bathochrome observé en milieu alcalin. En milieu neutre et alcalin, ce spectre est semblable à celui des indolénines 11 et 12,



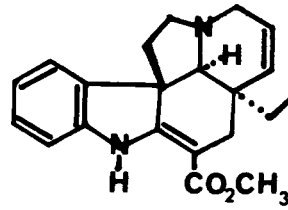
1 : 3  $\Delta$  H, 20  $\ominus$  H  
2 : 3  $\ominus$  H, 20  $\ominus$  H  
3 : 3  $\Delta$  H, 20  $\Delta$  H



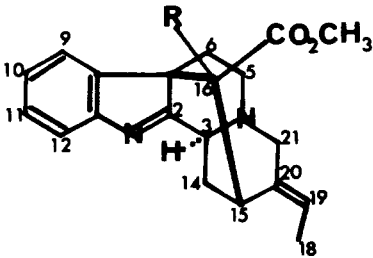
4



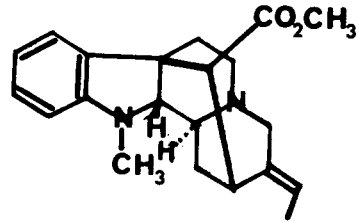
5



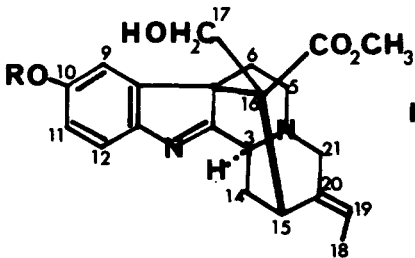
6



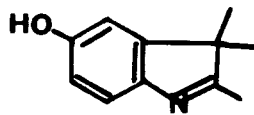
7 : R = CH<sub>2</sub>OH  
8 : R = CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>  
9 : R = H



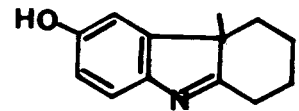
14



10 : R = H  
13 : R = CH<sub>3</sub>



11



12

de structure bien établie (27), ce qui vient à l'appui d'une substitution en C<sub>10</sub>. La méthoxy-10 désacétyl akuammiline (13) a déjà été caractérisée dans *Vinca minor* L. (28), mais une corrélation entre les alcaloïdes 10 et 13 n'a pu être établie faute de quantité suffisante.

TABLEAU 1. Comparaison des spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (400 MHz), de la désacétyl akuammiline (7), de la désacétyl desformoakuammiline (9) et de l'hydroxy-10 désacétyl akuammiline (10).

Proton	déplacements chimiques			s: singulet, d: doublet, q: quadruplet, m: massif, J(Hz)
	7	9	10	
C <sub>3</sub> -H.....	4,60	4,77	4,56	d, J <sub>3,14b</sub> =5
C <sub>5</sub> -H <sub>a</sub> .....	2,05	2,03	2,02	dd, J <sub>5a,5b</sub> =14, J <sub>5a,6a</sub> =4
C <sub>5</sub> -H <sub>b</sub> .....	3,64	3,74	3,67	m
C <sub>6</sub> -H <sub>a</sub> .....	2,58	2,63	2,64	m
C <sub>6</sub> -H <sub>b</sub> .....	2,65	2,79	2,64	m
C <sub>14</sub> -H <sub>a</sub> .....	1,91	1,78	1,90	dd, J <sub>14a,14b</sub> =14, J <sub>14a,15</sub> =3
C <sub>14</sub> -H <sub>b</sub> .....	2,45	2,75	2,42	d élargi, J <sub>14b,14a</sub> =14
C <sub>15</sub> -H.....	3,64	3,54	3,67	m
C <sub>16</sub> -H.....		2,10		d, J <sub>16,15</sub> =8
C <sub>17</sub> -H <sub>2</sub> .....	2,93		3,00	q, AB, J=12
C <sub>18</sub> -H <sub>3</sub> .....	1,63	1,57	1,60	dd, J <sub>18,19</sub> =7, J <sub>18,21b</sub> =2,5
C <sub>19</sub> -H.....	5,45	5,56	5,46	m
C <sub>21</sub> -H <sub>a</sub> .....	3,14	3,20	3,14	d, J <sub>21a,21b</sub> =17
C <sub>21</sub> -H <sub>b</sub> .....	4,09	4,13	4,08	dd, J <sub>21b,21c</sub> =17, J <sub>21b,18</sub> =2,5
C <sub>17</sub> -H <sub>2</sub> OH.....	3,64		3,67	m
CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> .....	3,86	3,75	3,82	s
protons aromatiques:				
C <sub>9</sub> -H.....	7,55 ou 7,65	7,45 ou 7,64	6,97	7 et 9: d, J <sub>9,10</sub> =7,5 10: d, J <sub>9,11</sub> =2
C <sub>10</sub> -H.....	7,20 ou 7,35	7,20 ou 7,36		dd, J <sub>10,9</sub> =7,5 et H <sub>10,11</sub> =7,5
C <sub>11</sub> -H.....	7,35 ou 7,20	7,36 ou 7,20	6,70	7 et 9: dd, J <sub>11,10</sub> =7,5 et J <sub>11,12</sub> =7,5 10: dd, J <sub>11,12</sub> =7,5 et J <sub>11,9</sub> =2
C <sub>12</sub> -H.....	7,65 ou 7,55	7,64 ou 7,45	7,37	d, J <sub>12,11</sub> =7,5

La présence d'akuammiline (8) et de dérivés n'a jamais été signalée dans le genre *Catharanthus*, alors que la cathafoline (14), de même squelette est présente dans l'espèce *longifolius* (29). Par contre, l'akuammiline (8) a été isolée très récemment de cultures de cellules de *C. roseus* (30).

Le composé 4 a été identifié par comparaison directe avec le produit d'oxydation de l'ajmalicine (1) (24) et le composé 5 a été comparé au produit de transposition de 4 en milieu alcalin.

La caractérisation de ces composés montre l'originalité de la souche étudiée; sa capacité d'hydroxylation de la partie tryptaminique d'alcaloïdes indoliques représente un des aspects de son potentiel de biosynthèse. L'originalité de cette souche permet d'espérer que ses propriétés antimittotiques sont dues à un ou des composés nouveaux qui pourront être identifiés avec des quantités plus importantes de matière première.

## PARTIE EXPERIMENTALE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Les spectres infra-rouge (ir, CHCl<sub>3</sub>, ν cm<sup>-1</sup>) ont été enregistrés sur appareil Perkin-Elmer "257". Les spectres ultraviolet (uv, EtOH, λ max nm) ont été enregistrés sur un appareil Bausch et Lomb type "Spectronic 505". Les courbes de dichroïsme circulaire ont été enregistrées (d.c, EtOH, λ max nm (Δε)) sur un appareil "Roussel-Jouan Dichrographe II". Les spectres de masse (s.m.) ont été exécutés sur spectrographe AEI "type MS 50". Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (rmn <sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>, TMS δ=0 ppm) ont été réalisés sur un prototype I.E.F. 400 MHz. Les chromatographies analytiques sur couche mince (C.M.) ont été effectuées sur Kieselgel G, selon Stahl et les chromatographies préparatives sur couche épaisse (C.C.E.) avec le Kieselgel HF 254+366. La révélation a été faite au réactif (sulfate d'ammonium cérique Ce<sub>IV</sub> (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 2 [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>], 2 H<sub>2</sub>O (31)).

CULTURES DE TISSUS ET EXTRACTION DES ALCALOÏDES.—Le matériel et les méthodes utilisées ont été décrits précédemment (7).

SÉPARATION ET IDENTIFICATION DES ALCALOÏDES.—L'extrait brut obtenu (1,8 g) a été grossièrement fractionné par filtration sur une colonne de diamètre 30 mm contenant 220 g d'un gel de Sephadex LH 20 (solvant d'entraînement: chloroforme-méthanol: 3-7). Des sous-fractions de 5 ml sont réunies en fonction de leur similitude de composition en C.C.M. (révélation au réactif C.A.S.). On obtient ainsi vingt fractions dont cinq ont été purifiées sur C.C.E.

*Fraction 10.*—La séparation des constituants de la fraction 10 (210 mg) par C.C.E. de silice (éluant: acétate d'éthyle-méthanol, 90-10) fournit 61 mg d'un mélange purifié par C.C.E. de silice (éluant: éther-méthanol, 90-10) pour conduire à 20 mg de désacétyl akuammiline (7).

*Fraction 11.*—La fraction 11 (110 mg) est purifiée par C.C.E. de silice (éluant: chloroforme-méthanol, 95-5) et conduit à 40 mg de désacétyl-akuammiline (7) et 15 mg d'ajmalicine (1).

*Fraction 12.*—Les constituants d'une partie (35 mg) de la fraction 12 (160 mg) sont séparés par C.C.E. de silice (éluants: benzène-acétate d'éthyle-méthanol, 40-40-20 et chloroforme-méthanol, 90-10); on obtient ainsi 4,4 mg d'hydroxy 10-désacétyl-akuammiline (10) et 20 mg de désacétyl-akuammiline (7).

*Fraction 13.*—La cristallisation de la fraction 13 dans le méthanol fournit 103 mg d'ajmalicine (1). Les eaux-mères de cristallisation sont chromatographiées sur C.C.E. de silice (éluant: chloroforme-méthanol, 98-2) et conduisent à 10 mg de tabersonine (6), 8 mg d'ajmalicine (1) et à 70 mg d'un mélange. Celui-ci est purifié sur C.C.E. de silice (éluants: chloroforme-acétate d'éthyle-méthanol, 80-15-5 et éther-méthanol, 97-3). On obtient ainsi 24 mg d'épi-3 ajmalicine (2).

*Fraction 14.*—Après cristallisation de la fraction 14 (160 mg) dans le méthanol, on obtient 67 mg d'ajmalicine (1). Les eaux-mères sont purifiées sur C.C.E. de silice (éluant: (chloroforme-méthanol 98-2). On isole ainsi 20 mg d'ajmalicine 1 et 5 mg de tétrahydroalstonine (3).

CARACTÉRISTIQUES SPECTRALES DE L'HYDROXY-10 DÉSACÉTYL-AKUAMMILINE (10).— $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CHCl}_3$ ): 3000, 1730, 1620  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu$   $\lambda$  max (EtOH): 226, 284, 300;  $\nu$   $\lambda$  max (EtOH-NaOH 1%): 230, 305, 346; d.c.  $\lambda$  max (EtOH): 275(+), 234(-); sm  $m/z$ : 368 ( $\text{M}^+$ , 100%), 351 (5%), 337 (90%), 309 (20%), 277 (15%), 265 (16%), 268 (15%), 196 (8%); rnm  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ ): cf. tableau 1.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur P. Potier pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, Madame L. Le Men-Olivier, Mademoiselle M. Pais et Monsieur J.-L. Pousset pour la fourniture d'échantillons de référence.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur S. Kan pour nous avoir permis d'enregistrer les spectres de RMN sur le prototype I.E.F. 400 MHz à l'Institut d'Électronique Fondamentale d'Orsay et à Monsieur A. Picot pour d'utiles discussions.

Ce travail fait partie d'un programme soutenu par une aide de la D.G.R.S.T. (contrat D.G.R.S.T. n° 79.7.0852) que nous remercions.

Received 23 April 1982

#### BIBLIOGRAPHIE

1. D. P. Carew, *The Catharanthus Alkaloids*, W. I. Taylor and N. R. Farnsworth éd. Marcel Dekker, New York (1975) et réf. citées.
2. K. Erdelsky, L. Holickova, *Physiol. Plantarum*, XV, 1 (1978).
3. M. H. Zenk, H. El Shagi, H. Arens, J. Stöckigt, E. W. Weller, B. Deus, *Plant Tissue cultures and its biotechnological application*. W. Barz, E. Reinhard and M. H. Zenk éd., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970, pp. 27-43.
4. T. I. Andreeva et L. N. Bereznegovskaya, *Nauk. Dokl. Vyss. Skol. Biol.*, 7, 107 (1978).
5. D. Courtois, Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Paris (1978).
6. V. Pétiard, *Physiol. Vég.*, 18, 331 (1980).
7. V. Pétiard, F. Guéritte, N. Langlois et P. Potier, *Physiol. Vég.*, 18, 711 (1980).
8. A. I. Scott, H. Mizukami, T. Hirata and S. L. Lee, *Phytochemistry*, 19, 488 (1980).
9. W. G. W. Kurz, K. B. Chatson, F. Constabel, J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleigh, K. L. Stuart and B. R. Worth, *Helv. Chim. Acta*, 63, 1891 (1980).
10. W. G. W. Kurz, K. B. Chatson, F. Constabel, J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleigh, K. L. Stuart and B. R. Worth, *Phytochemistry*, 19, 2583 (1980).
11. J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleigh, K. L. Stuart, B. R. Worth, W. G. W. Kurz, K. B. Chatson and F. Constabel, *Phytochemistry*, 19, 2589 (1980).
12. W. G. W. Kurz, K. B. Chatson, F. Constabel, J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, J. K. Sleigh, K. L. Stuart, B. R. Worth, *Planta Med.*, 42, 22 (1981).
13. J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleigh, K. L. Stuart and B. R. Worth, *Heterocycles*, 14, 765 (1980).
14. J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleigh, K. L. Stuart and B. R. Worth, *Helv. Chim. Acta*, 64, 1837 (1981).
15. J. P. Kutney, L. S. L. Choi, P. Kolodziejczyk, S. K. Sleigh, K. L. Stuart, B. R. Worth, W. G. W. Kurz, K. B. Chatson and F. Constabel, *J. Nat. Prod.*, 44, 536 (1981).
16. F. Constabel, S. Rambold, K. B. Chatson, W. G. W. Kurz and J. P. Kutney, *Plant Cell Reports*, 1, 3 (1981).
17. W. Kohl, M. Vogelmann and G. Höfle, *Planta Med.*, 39, 283 (1980).
18. J. Stöckigt, *Planta Med.*, 39, 285 (1980).
19. M. H. Zenk (Boehringer Mannheim) Ger. Offen. 2,639,876 (C07 D459/00) 09 Mai 1978, Appl 04 Sept. 1976.
20. V. Pétiard, International Research Congress on Natural Products as Medicinal Agents, Strasbourg, 6-11 Juillet 1980.

21. F. Guéritte, Thèse de Doctorat ès Sciences Physiques, Orsay (1980).
22. E. J. Shellard, J. D. Phillipson et D. Gupta, *Planta Med.*, **16**, 436 (1968).
23. W. I. Taylor (to CIBA Cap) U.S. 3,238,213 (Cl. 260-287), March 1, 1966, Appl. July 6, 1962 and Jan. 31, 1963.
24. N. Finch, C. W. Gemenden, I. Hsiu-Chu Hsu, A. Kerr, G. A. Sim and W. I. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2229 (1965).
25. a) L. Le Men Olivier, Thèse de Doctorat ès Sciences Physiques, Paris (1964).  
b) L. Le Men Olivier, J. Lévy, J. Le Men, M.-M. Janot, H. Budzikiewicz and C. Djerassi, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 868 (1965).
26. J. L. Pousset, J. Poisson, L. Olivier, J. Le Men, M.-M. Janot, *C. R. Acad. Sci.*, **261**, 5538 (1965).
27. A. Picot, Thèse de Doctorat ès Sciences Physiques, Orsay (1975).
28. S. Savaskan, I. Kompis, M. Hesse et H. Schmidt, *Helv. Chim. Acta*, **55**, 2861 (1972).
29. P. Rasoanaivo, N. Langlois, P. Bladon et P. Potier, *Tetrahedron Letters*, 1425 (1973).
30. W. Kohl, B. Witte, G. Hoefle, *Z. Naturforsch., B.: Anorg. Chem., Org. Chem.*, **36B** (9), 1153 (1981).
31. N. R. Farnsworth, R. N. Blomster, D. Damratoski, W. A. Meer et L. V. Cammarato, *Lloydia*, **27**, 302 (1964).

5TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MEDICINAL PLANTS,  
CONFERENCE CENTRE, UNIVERSITY OF IFE, NIGERIA

July 13 — July 15, 1983

Theme: *Anti-infective agents of higher plants origin.*

Contact:

Dr. C. O. Adewunmi, or The Secretary,  
Drug Research and Production Unit,  
Faculty of Pharmacy, University of Ife,  
Ile-Ife, Nigeria.

Deadline for submission of Abstracts is April 30, 1982.