

RUBIACÉES D'OCÉANIE: ALCALOÏDES DE *PSYCHOTRIA OLEOIDES* DE NOUVELLE-CALÉDONIE ET DE *CALYCODENDRON MILNEI* DU VANUATU (NOUVELLES-HÉBRIDES)¹

FRANCINE LIBOT, CHRISTINE MIET, NICOLE KUNESCH, JACQUES E. POISSON,

Laboratoire de Chimie des Substances Thérapeutiques Naturelles,
CNRS UA 496, Centre d'Etudes Pharmaceutiques, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

JACQUES PUSSET et THIERRY SÉVENET

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France

ABSTRACT.—Three new alkaloids, quadrigemine C [1], isopsychotridine B [2], and isopsychotridine A [3], have been isolated from *Psychotria oleoides*, in addition to the known psychotridine [4] and hodgkinsine [5]. Their structures were determined from spectral data. The stem bark of *Calycodendron milnei* contains hodgkinsine [5] and calycosidine, a new structurally related alkaloid.

La tribu Psychotrieae de la famille des Rubiacées est assez répandue dans toute la zone tropicale avec 800 espèces connues (1), mais sa classification taxonomique exacte n'est pas encore très précise. S'il n'existe pas de classification générale de la tribu, on distingue cependant trois genres possédant de grandes analogies: *Psychotria*, *Calycodendron*, et *Calycosia*. Les *Psychotria* ont été peu étudiés jusqu'ici du point de vue chimique, à l'exception de *Psychotria beccarioides* Wernh. (2), *Psychotria forsteriana* A. Gray (3,4) et *Psychotria mannii* Hiern (4). Les *Psychotria* de Nouvelle-Calédonie peuvent d'après Guillaumin (5) être divisés en deux sous-genres *Cephaelis* et *Eu-Psychotria* auquel appartient *Psychotria oleoides* Schlechter récolté par deux d'entre nous (J.P., T.S.).

Le *Calycodendron milnei* (A. Gray) A.C. Smith a été, quant à lui, récolté au Vanuatu (Nouvelles-Hébrides).

L'étude des alcaloïdes des feuilles de *P. oleoides* et d'un échantillon d'écorces de tronc de *C. milnei* fait l'objet de ce travail.

Trois alcaloïdes nouveaux—la quadrigémine C [1] l'isopsychotridine B [2] et l'isopsychotridine A [3]—ont pu être isolés pour la première fois et leurs structures planes de type pyrrolidinoindolinique, déterminées. Elles sont étroitement apparentées à celles de la psychotridine [4] et de l'hodgkinsine [5] isolées de *P. beccarioides* (2) et d'*Hodgkinsonia frutescens* F. Muell. (6).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

ALCALOÏDES DES FEUILLES DE *P. OLEOIDES*.—La majorité des alcaloïdes isolés sont obtenus à partir de la fraction insoluble dans le CH_2Cl_2 de l'extrait total (3,7% d'alcaloïdes totaux). Deux chromatographies successives sur alumine fournissent l'hodgkinsine [5] (identifiée par comparaison avec un échantillon de référence), dont la structure pyrrolidinoindolinique trimère a été établie par cristallographie de rayons X (7). Après plusieurs purifications par clhp, on isole ensuite quatre alcaloïdes dont la psychotridine [4] également identifiée à l'aide d'un échantillon de référence. Les trois autres bases sont très polaires, ce qui a rendu leur isolement particulièrement difficile.

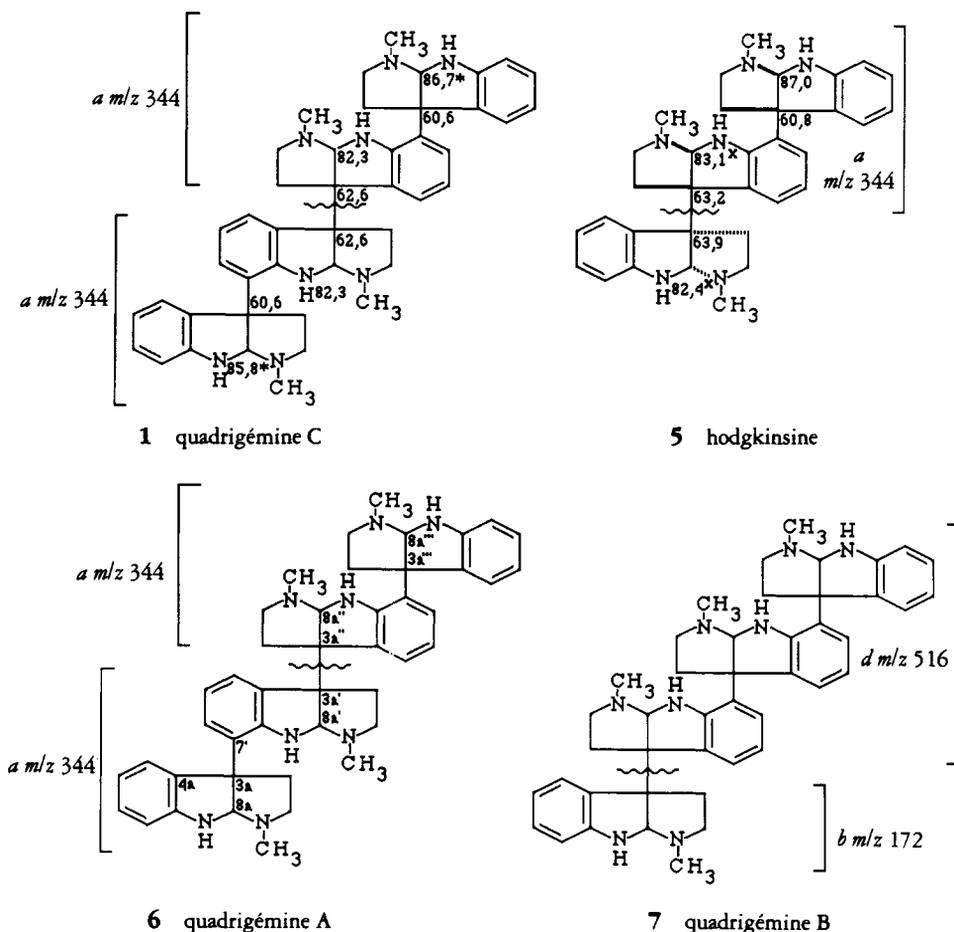
La quadrigémine C [1] est amorphe et lévogyre $[\alpha]_D = -69^\circ$ (CHCl_3). Son poids moléculaire et son analyse élémentaire en $\text{C}_{44}\text{H}_{50}\text{N}_8$ effectuée en smhr de l'ion moléculaire, l'apparentent à un tétramère composé de quatre unités fondamentales pyr-

¹Plantes de Nouvelle-Calédonie No. 110, pour le No. 109, voir K. Ikhiri, A. Ahond, C. Poupat, P. Pusset, et T. Sévenet, *J. Nat. Prod.* à paraître.

rolidinoindoliniques du type des quadrigémines A [6] et B [7], isolées d'*H. frutescens* (8).

Le spectre uv (EtOH), λ max nm log (ϵ) 246 (4,45), 306 (4,18) ainsi que le spectre ir (CHCl_3) ν cm^{-1} = 1600, indiquent un chromophore indoline. L'examen de la fragmentation révélée par le sm de la quadrigémine C par comparaison avec celles de l'hodgkinsine [5] (2), des quadrigémines A [6] et B [7] (8) et de la psychotridine [4] (2) conduit à proposer la formule 1 pour ce nouvel alcaloïde.

En effet, on remarque un pic m/z 344 d'intensité relative 100%, comme dans les spectres de la quadrigémine A [6] (8), de la psychotridine [4] et de l'hodgkinsine [5] (2). Il est attribué à l'ion *a*. La fragmentation principale est obtenue dans ce type de molécule par rupture de la liaison $\text{C}_{3a'}$ - $\text{C}_{3a''}$ entre carbones indoliniques et non C_{3a} - $\text{C}_{7'}$, qui engage un cycle aromatique. L'existence du pic de base à m/z 344 indique que la quadrigémine C [1] se coupe en deux "moitiés" (schéma 1) liées l'une à l'autre par les carbones indoliniques en position $3a'$ comme la quadrigémine A [6]. Le reste de la fragmentation n'étant pas identique à celle de la quadrigémine A, il est probable que la configuration des centres $3a$, $3a'$, $3a''$ et $3a'''$ est différente. Le spectre de rmn^{13}C vient à l'appui de ce résultat (9). En se limitant à l'analyse de la région des carbones alicycliques, on observe deux groupes de signaux à δ ppm 86,7 (CH), 85,8 (CH), 82,3



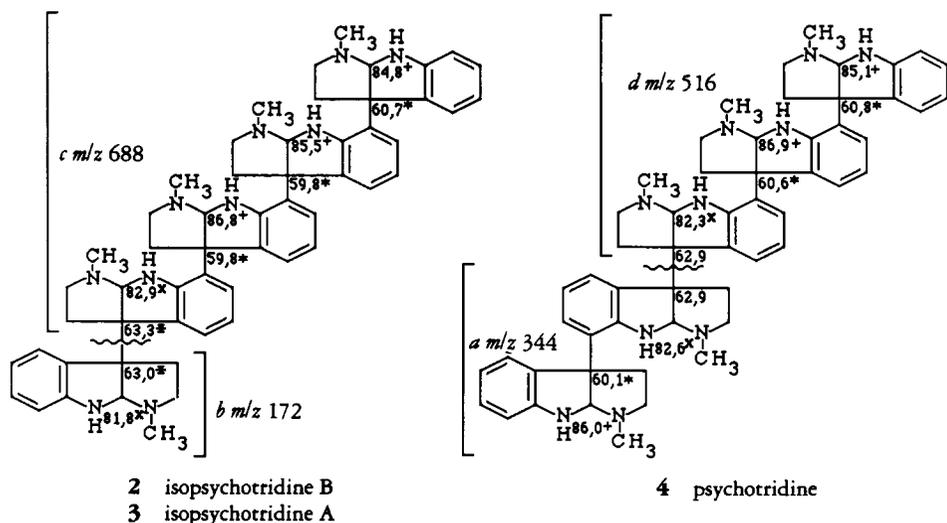
*Les valeurs signalées peuvent être permutées.

($2 \times \text{CH}$) attribués aux C_{8a} et à δ ppm 62,6 ($2 \times \text{C}$), 60,6 ($2 \times \text{C}$) attribués aux C_{3a} . La symétrie des valeurs est immédiatement remarquable.

Le méthine résonnant au champ le plus haut (82,3 ppm) correspond au $\text{C}_{8a'}$, carbone angulaire N-CH-N, d'une unité pyrrolidinoindolinique reliée à une autre unité par une liaison $\text{C}_{3a'}-\text{C}_{3a''}$ entre carbones analogues comme dans la chimonanthine [8], et qui subit de ce fait un effet γ dû à des interactions 1-3 diaxiales des trois autres liaisons carbone-carbone portées par $\text{C}_{3a''}$. Cet effet est moins intense pour les C_{8a} d'une unité substituée par un noyau aromatique. Les différents C_{8a} de ces molécules se distinguent donc très nettement en fonction de la substitution du carbone vicinal 3a, ce qui est confirmé par l'examen du spectre de rmn^{13}C de l'hodgkinsine [5] dans lequel les signaux correspondant aux deux types de C_{8a} sont à δ ppm 87,0 et 83,1 ou 82,4.

Pour la quadrigémine C, les valeurs des résonances caractéristiques sont indiquées sur la formule 1 et sont en bon accord avec un enchaînement symétrique de quatre unités pyrrolidinoindoliniques sans qu'il soit possible de préciser la configuration des centres asymétriques.

L'isopsychotridine B [2] est également amorphe, mais dextrogyre $[\alpha]_{\text{D}} = +70^\circ$ (CHCl_3). Son poids moléculaire de 862 ainsi que l'analyse élémentaire $\text{C}_{55}\text{H}_{62}\text{N}_{10}$ (smhr) sont identiques à ceux de la psychotridine [4]. Ces données jointes à la présence du chromophore indolinique révélé par le spectre uv (EtOH) λ_{max} nm log (ϵ) 246 (4,48), 306 (4,16) et par le spectre ir (CHCl_3) $\nu = 1610 \text{ cm}^{-1}$ indiquent un enchaînement de cinq unités pyrrolidinoindoliniques. L'étude de la fragmentation de cette molécule en sm, ainsi que l'examen de son spectre de rmn^{13}C confirment que cet alcaloïde doit être un isomère de la psychotridine [4]. Le spectre de masse montre un pic de base à m/z 172 correspondant à l'ion *b* et deux pics également intenses à m/z 689 et m/z 688, ce dernier attribué à l'ion *c* (Schéma 2). Par contre les pics correspondant aux ions m/z 344 (ion *a*) et m/z 516 (ion *d*) sont présents mais de plus faible intensité relative, alors qu'ils représentent la fragmentation majoritaire dans le spectre de la psychotridine [4]. Ceci conduit à proposer la formule plane 2 avec l'enchaînement de type chimonanthine [8] disposé à l'une des extrémités de la molécule et dont la séparation est à l'origine des ions *b* et *c*.



*Les valeurs signalées peuvent être permutées.

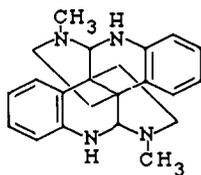
Le spectre de $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ est analysé par comparaison avec celui de la psychotridine [4]. Les valeurs des résonances des C_{3a} et C_{8a} figurent sur la formule 2. On remarque que les déplacements des méthines $8a$ se regroupent comme dans la psychotridine [4] autour de 82 ppm ($2 \times \text{CH}$), correspondant à un enchaînement de type chimonanthine [8] et autour de 85 ppm ($3 \times \text{CH}$) indiquant alors une liaison engageant un C_{3a} et un carbone aromatique. Cependant, à l'encontre de la psychotridine, less résonances de C_{3a} et C_{3a}' d'une part, de C_{8a} et C_{8a}' d'autre part donnent des signaux distincts ce qui exclut une disposition symétrique autour de la partie "chimonanthine". Le seul enchaînement possible pour l'isopsychotridine B reste donc la formule 2 ce qui confirme les données de la sm.

L'isopsychotridine A [3], isolée en très petite quantité, sous forme amorphe, est dextrogyre $[\alpha]_D = +66^\circ$ (CHCl_3), et présente également un spectre uv à chromophore indoline. L'analyse élémentaire à haute résolution du pic moléculaire donne une formule en $\text{C}_{55}\text{H}_{62}\text{N}_{10}$ ($M = 862$). Cet alcaloïde est donc un isomère de la psychotridine [4] et de l'isopsychotridine B [2]. Le spectre de masse indique une fragmentation analogue à celle de l'isopsychotridine B avec les ions *b* à m/z 172 (85%), *c* à m/z 688 (68%), et m/z 689 (100%) (Schéma 2). Cette fragmentation est différente de celle de la psychotridine et nous proposons pour l'isopsychotridine A, un enchaînement de cinq unités, indentique à celui de l'isopsychotridine B et représenté par la même formule plane 2. La faible quantité de produit disponible n'a pas permis de préciser cette structure, notamment par une étude de $\text{rmn } ^{13}\text{C}$.

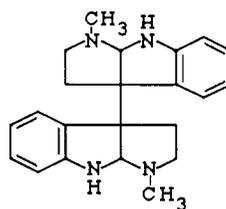
ALCALOÏDES DES ÉCORCES DE TRONC DE *C. MILNEI*.—L'extrait total des alcaloïdes a été obtenu par percolation à l'alcool des écorces broyées. Après concentration du percolat, le résidu a été repris par de l'eau acide. L'extraction par du CH_2Cl_2 après alcalinisation par le Na_2CO_3 , a fourni l'hodgkinsine [5], tandis que l'alcalinisation par la soude a permis l'isolement d'une base nouvelle, la calycosidine, isomère de l'hodgkinsine, dont la structure dérivée de la calycanthine [9] fera l'objet d'une publication détaillée ultérieure.

Il convient de noter ici que la calycosidine n'a pas été retrouvée lors de l'analyse d'un lot de cette espèce récoltée à une autre époque, qui contient l'hodgkinsine et des bases du même type, mais à un degré de condensation plus élevé² (10).

En conclusion, les alcaloïdes qui viennent d'être décrits proviennent tous de la tryptamine. A l'exception de la calycosidine, ils sont constitués de plusieurs unités fondamentales de type pyrrolidinoindolinique dont le représentant le plus simple est la chimonanthine [8] tandis qu'une transposition oxydative différente de la tryptamine conduit à la calycanthine [9] (11). Leur structure a été établie grâce aux sm et de rmn , particulièrement la $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ qui constitue l'un des meilleurs moyens d'identification des alcaloïdes de cette famille dont les signaux des carbones $8a$ (-N-CH-N-) sont caractéristiques. Il nous a été impossible d'obtenir des dérivés cristallisés qui auraient permis la détermination de la stéréochimie des centres asymétriques de ces alcaloïdes par cristallographie de rayons X.



9 calycanthine



8 chimonanthine

²H. Saad, R. Anton, J. Pusset, et T. Sévenet, à paraître.

Les deux espèces étudiées ici possèdent donc en plus de leurs analogies morphologiques, une bonne similitude biochimique puisque l'on y trouve le même type d'alcaloïdes particuliers à enchaînement condensé et répétitif dérivé de la tryptamine.

Ces dérivés possèdent des activités biologiques intéressantes. Certains d'entre eux présentent des actions antibiotiques d'après les résultats préliminaires obtenus à l'Institut Pasteur de Nouméa³ et au service de microbiologie de l'ICSN (CNRS, Gif-sur-Yvette) (9). De plus, ils ont été reconnus comme inhibiteurs de l'agrégation des plaquettes (12).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

APPAREILLAGE.—Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre électronique Zeiss à 578 nm. Les différents spectres sont enregistrés sur les appareils suivants: Unicam SP 1800, uv (EtOH); Perkin-Elmer 257, ir (CHCl₃); sm, à 70 ev et 20 ev sur AEI MS 9 (ICSN, CNRS, Gif-sur-Yvette) et MS 902 (Laboratoire Central du CNRS, Lyon), appareils également utilisés pour effectuer les analyses à haute résolution; rmn ¹H (CDCl₃/TMS), Varian T 60 à 60 MHz et appareil prototype EIF 240 à 240 MHz de l'Institut d'électronique fondamentale d'Orsay (13); rmn ¹³C (CDCl₃/TMS), Varian CFT 20. Les abréviations utilisées sont: s=singlet, m=multiplet.

MATÉRIEL VÉGÉTAL.—Les lots Sévenet-Pusset 1459 et 1910 de feuilles de *P. oleoides* étudiés ont été récoltés en 1978 et 1980, à la Montagne des Sources (Nouvelle-Calédonie), tandis que le lot Sévenet 1219 d'écorces de tronc de *C. milnei* a été récolté en 1976 au Vanuatu (Nouvelles-Hébrides). Les échantillons d'herbier ont été déposés au Centre ORSTOM de Nouméa.

EXTRACTION ET ISOLEMENT DES ALCALOÏDES.—*P. oleoides*.—4500 g de poudre de feuilles préalablement imprégnés par NH₄OH à 20% sont percolés au soxhlet par de l'EtOH à 96°. Le percolat est concentré sous pression réduite et repris par une solution aqueuse d'HCl à 5%. Cette solution est lavée par CH₂Cl₂ puis alcalinisée par NH₄OH jusqu'à pH 9-10 en présence de CH₂Cl₂. Un précipité se forme qui est dissous dans MeOH. La solution méthanolique est évaporée à sec sous pression réduite (31,1 g) et constitue le résidu alcaloïdique I. La phase CH₂Cl₂ est lavée, séchée, évaporée de la même façon et fournit l'extrait alcaloïdique II de 134,7 g. Le rendement total des extraits I et II en alcaloïdes totaux est de 3,7%.

FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT I.—20 g d'extrait sont chromatographiés sur colonne de 1000 g d'Al₂O₃ (activité II-III). Le solvant d'élution est un mélange de polarité croissante à base de cyclohexane, d'Et₂O et de MeOH et permet d'obtenir deux fractions principales qui sont purifiées une nouvelle fois: (a) La fraction éluee à l'Et₂O pur (550 mg), rechromatographiée sur Al₂O₃ (activité II-III) avec le même solvant, conduit à l'obtention de 38 mg d'hodgkinsine [5]. (b) La fraction éluee avec le mélange Et₂O-MeOH (95:5) (6700 g), est chromatographiée en clhp (170 g silice, granulométrie 0,063-0,2 mm; pression = 12 bars, débit 1 ml/mm) en utilisant le mélange de solvants CHCl₃-MeOH-NH₄OH (87,5:10:2,5). Les fractions enrichies en alcaloïdes sont soumises une nouvelle fois à la même purification. On isole ainsi: 18 mg d'isopsychotridine A [3], 375 mg d'isopsychotridine B [2], 75 mg de psychotridine [4] et 450 mg de quadrigémine C [1].

FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT II.—1 g de l'extrait est chromatographié sur une colonne de 50 g d'Al₂O₃ (activité II-III). Le solvant d'élution est un mélange Et₂O/MeOH qui a permis d'isoler la quadrigémine D en très faible quantité (9).

C. milnei.—200 g d'écorces de tronc broyées sont percolés avec 5 l d'EtOH à 96°. Après concentration sous vide, le résidu est repris par 500 ml d'une solution aqueuse à 2% d'HCl. La solution acide est: (a) alcalinisée avec Na₂CO₃, puis extraite avec CH₂Cl₂ et conduit à l'obtention d'un résidu brut de 1,22 g, qui est ensuite purifié sur Al₂O₃ (activité I) et élué par CH₂Cl₂ contenant des proportions croissantes de MeOH. On isole ainsi 130 mg d'hodgkinsine [5]. (b) alcalinisée par de la soude, puis extraite classiquement avec CH₂Cl₂. On obtient ainsi un résidu brut de 600 mg, qui, purifié sur 18 g d'Al₂O₃ (activité I), fournit par élution avec CH₂Cl₂ contenant des proportions croissantes de MeOH, 80 mg de calycosidine amorphe.

DESCRIPTION DES ALCALOÏDES.—*Quadrigémine C* [1].—amorphe, [α]_D²⁰ = -69° (CHCl₃, c = 1); C₄₄H₅₀N₈ (smhr tr.: 690,4144; calc.: 690,4158); uv λ max nm (log ε) 246 (4,45), 306 (4,18); ir ν max cm⁻¹ 3370, 3240, 1660; sm m/z (%) 690 (M⁺) (2), 518 (3), 345 (72), 344 (100), 314 (52), 301 (56), 172 (44), 130 (21); rmn ¹H δ ppm 2,50 (m, 12 H), 4,23 (m), 4,65 (m), 5,07 (m), 5,67 (m), 6,63-7,15 (m);

³T. Sévenet, résultats non publiés.

rmn ^{13}C δ ppm 150,6, 132,2, 127,6, 126,2, 125,7, 124,8, 124,0, 123,6, 122,2, 118,5, 117,0, 116,1, 115,6, 108,7, 86,7, 85,8, 82,3, 62,6, 60,6, 53,2, 36,3, 35,2.

Isopsychotridine B [2].—amorphe, $[\alpha]_D^{20} = +70^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$); $\text{C}_{55}\text{H}_{62}\text{N}_{10}$ (smhr tr.: 862,5078; calc.: 862,5159); uv λ max nm (log ϵ) 246 (4,48), 306 (4,16); ir ν max cm^{-1} 3360, 3240, 1610; sm m/z (%) 862 (M^+) (34), 861 (20), 689 (83), 688 (66), 516 (20), 344 (55), 173 (100), 172 (93), 130 (55); rmn ^1H δ ppm 2,28 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,47 (m, 9H), 4,93 (m), 5,08 (m), 6,66-7,17 (m); rmn ^{13}C δ ppm 150,2, 148,7, 132,2, 127,9, 127,6, 125,6, 125,0, 124,5, 123,9, 123,4, 123,2, 122,0, 118,7, 118,2, 117,2, 108,7, 86,8, 85,5, 84,8, 82,9, 81,8, 63,3, 63,0, 60,7, 59,8, 52,0, 38, 35,3.

Isopsychotridine A [3].—amorphe, $[\alpha]_D^{20} = +66^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$); $\text{C}_{55}\text{H}_{62}\text{N}_{10}$ (smhr tr.: 862, 5183; calc.: 862,5159); uv λ max nm (log ϵ) 246 (4,47), 306 (4,15); ir ν max cm^{-1} 3360, 3260, 1610; sm m/z (%) 862 (M^+) (16), 861 (5), 689 (100), 688 (68), 658 (17), 646 (27), 344 (13), 173 (74), 172 (85); rmn ^1H δ ppm 2,31 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 2,47 (s, 3H), 2,49 (s, 3H), 6,45-7,14 (m).

Calycosidine.—amorphe, $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$); $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_6$ (smhr tr.: 518,3151; calc.: 518,3157); uv λ max nm (log ϵ) 245 (4,40), 310 (4,02); ir ν max cm^{-1} 3400, 3300, 1600; sm m/z (%) 518 (M^+) (100), 485 (15), 461 (29), 403 (19), 344 (19), 172 (27), 130 (10); rmn ^1H δ ppm 2,22 (s, 3H), 4,17 (s, 1H), 4,36 (s, 1H), 5,57 (s, 1H), 6,58-7,25 (m); rmn ^{13}C δ ppm, C: 148,1, 147,3, 144,5, 133,3, 128,7, 124,7, 118,9, 59,8; CH: 128,1, 126,8, 124,4, 123,6, 120,1, 119,9, 117,5, 117,4, 112,2, 110,4, 88,2, 74,5, 70,9; CH_2 : 46,2, 46,1, 38,2, 37,5, 35,4, 33,4, 33,1; N- CH_3 : 43,2, 42,1, 36,4.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Professeur Lamberton (Melbourne, Australie) de nous avoir envoyé les échantillons de référence d'hodgkinsine et de psychotridine ainsi que Mme Allorge pour son aide dans l'identification de *C. milnei*.

BIBLIOGRAPHIE

1. A. Engler, "Syllabus der Pflanzenfamilien," vol. 2, 1964, p. 421.
2. N.K. Hart, S.R. Johns, J.A. Lamberton, et R.E. Summons, *Aust. J. Chem.*, **27**, 639 (1974).
3. A. Roth, B. Kuballa, P. Cabalion, et R. Anton, *Planta Med.*, **3**, 289 (1985).
4. A. Roth, Thèse de doctorat 3^e cycle, Université Louis Pasteur, Strasbourg (1984).
5. A. Guillaumin, "Flore synoptique de la Nouvelle-Calédonie," Office de la Recherche Scientifique Coloniale, 1948, pp. 334-339.
6. E.F.L.J. Anet, G.K. Hughes et E. Ritchie, *Aust. J. Chem.*, **14**, 173 (1961).
7. J. Fridrichsons, M.F. Mackay, et Mc.L. Mathieson, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 3521 (1967).
8. K.P. Parry et G.F. Smith, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1671 (1978).
9. F. Libot, Thèse de doctorat d'Université, Orsay (1982).
10. H. Saad, Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg (1986).
11. E.S. Hall, F. McCapra, et A.I. Scott, *Tetrahedron*, **23**, 4131 (1967).
12. A. Beretz, A. Roth-Georger, G. Corre, B. Kuballa, R. Anton et J.P. Kazenave, *Planta Med.*, **4**, 300 (1985).
13. S.K. Kan, P. Gonord, M. Fan, M. Sauzade, et J. Courtieu, *J. Rev. Sci. Instrum.*, **49**, 785 (1978).

Received 25 November 1986