

NORSTEPHALAGINE ET ATHEROSPERMIDINE, DEUX APORPHINES D'ARTABOTRYS MAINGAYI RELAXANTES DU MUSCLE LISSE¹

DIEGO CORTES,*

Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Médecine et Pharmacie, Université de Rouen,
76800 Saint Etienne du Rouvray, France

M. YOLANDA TORRERO, M. PILAR D'OCÓN, M. LUZ CANDENAS,

Departamento de Farmacología y Farmacotecnia, Facultad de Farmacia, Avda. Blasco Ibañez-13,
46010 Valencia, Spain

ANDRÉ CAVÉ,

Laboratoire de Pharmacognosie, URA 496 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud,
92290 Châtenay-Malabry, France

et A. HAMID A. HADI

University of Malaya, Kuala Lumpur, Malasia

ABSTRACT.—Nine isoquinoline alkaloids have been isolated from the bark of *Artabotrys maingayi*: four noraporphines (norstephalagine [1], 3-hydroxynornuciferine, anonaine, and nor-nuciferine), one 7-hydroxyaporphine (ushinsunine), three oxoaporphines (atherospermidine [2], lirioidenine, and lysicamine), and one protoberberine (discretamine). The effects of the main alkaloids, norstephalagine and atherospermidine, have been studied on the Ca-dependent contractile activity of smooth muscle (uterus). Both norstephalagine and atherospermidine show relaxing activity on rat uterine contractions induced by KCl or rhythmic contractions induced by oxytocin in the presence of Ca, but only atherospermidine can relax oxytocin- or vanadate-induced contractions in a Ca-free medium.

Dans le cadre d'une étude sur les modifications du transport de calcium à travers la membrane cellulaire provoquées par plusieurs types d'alcaloïdes isoquinoléiques, nous avons décrit récemment l'activité de benzyloisoquinoléines, de bisbenzyloisoquinoléines, ainsi que de cularines (1-3). Les alcaloïdes à squelette aporphine étant chimiquement très proches des isoquinoléines déjà étudiées, il nous a paru intéressant d'examiner l'activité des alcaloïdes aporphiniques d'*Artabotrys maingayi* Hk. f. et Th. Nous avons donc comparé l'activité de la norstephalagine (noraporphine) et de l'atherospermidine (oxoaporphine), alcaloïdes principaux de cette espèce à celle des isoquinoléines précédemment étudiées.

L'*A. maingayi* est une plante grimpante qui appartient au groupe des espèces asiatiques du genre *Artabotrys* (Annonacées) (4). C'est une espèce qui, quoique fréquente dans la jungle de McRitche à Singapour, est peu représentée dans les herbiers (5). Nous avons étudié un échantillon récolté en Malaisie.

Comme tous les genres de la famille des Annonacées, le genre *Artabotrys* est caractérisé par l'existence d'alcaloïdes isoquinoléiques. Il présente souvent la particularité de contenir des alcaloïdes isoquinoléiques de nature catécholique (6-8), type d'alcaloïdes que nous n'avons pas retrouvé dans le cas présent.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'extraction des alcaloïdes des écorces d'*A. maingayi* a été effectuée de manière habituelle (9). Les alcaloïdes totaux (1,55%) ont été traités par chromatographies sur colonnes de silice. Neuf alcaloïdes, tous de nature isoquinoléique,

¹Partie 94 dans la série "Alcaloïdes des Annonacées." Pour la partie 93 voir F. Roblot, R. Hocquemiller, et A. Cavé, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1989, sous presse.

ont été isolés et identifiés par mise à profit de leurs données physiques et spectrales (rmn, sm, ir, uv), corrélation chimique, et comparaison avec des échantillons authentiques (Tableau 1).

ique, un groupe carbonyle sur le carbone benzylique qui provoque une délocalisation électronique.

Nous avons étudié l'activité relaxante du muscle lisse de la norstephalagine [1]

TABLEAU 1. Alcaloïdes d'*Artabotrys maingayi*.

Type	Alcaloïde	Teneur ^a
Noraporphines	norstephalagine [1]	22
	anonaine	11
	normuciferine	11
	hydroxy-3 normuciferine	6
Hydroxy-7 aporphine	ushinsunine	1,5
Oxoaporphines	atherospermidine [2]	19
	liriodenine	1
	lysicamine	1
	Tétrahydroprotoberberine	discretamine

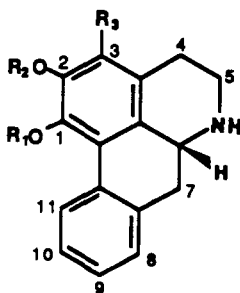
^aTeneur exprimée en % par rapport aux alcaloïdes totaux.

Nous avons étudié l'activité relaxante du muscle lisse des deux aporphines majoritaires: la norstephalagine [1] et l'atherospermidine [2]. Ces deux alcaloïdes sont de structures apparentées puisque ce sont des aporphines substituées de façon identique. Leur différence portent sur leur degré d'oxydation. La norstephalagine [1] est une méthylènedioxy-1,2 méthoxy-3 noraporphine, affectée uniquement par la densité électronique due au système biphenyle; de configuration absolue 6a(R), elle est caractérisée par une non planéité de la molécule due à la torsion du système biphenyle. Par contre l'atherospermidine [2] (méthylènedioxy-1,2 méthoxy-3 oxoaporphine) est une molécule totalement conjuguée et parfaitement plane. Elle possède, outre un noyau pyridin-

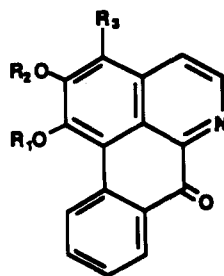
et de l'atherospermidine [2] (sous forme de chlorhydrate), sur des préparations d'utérus de rats.

Dans un première groupe d'expériences nous avons employé le KCl (56,3 mM), qui provoque la dépolarisation de la membrane cellulaire; ceci conduit à l'ouverture des canaux voltage-dépendant (10, 11). L'entrée de calcium dans la cellule par ces canaux est responsable de la contraction. Dans ces conditions on obtient des plateaux de contraction qui sont réduits de façon dose-dépendante par l'addition de 1 et 2, leurs DE 50 et la relaxation maximale étant les mêmes pour les deux produits (Figure 1).

Dans le deuxième type d'expériences, l'agoniste employé est l'oxytocine, produit qui agit de préférence sur des récepteurs membranaires spécifiques (11, 12).



1 $R_1=R_2=-CH_2-$, $R_3=OMe$



2 $R_1=R_2=-CH_2-$, $R_3=OMe$

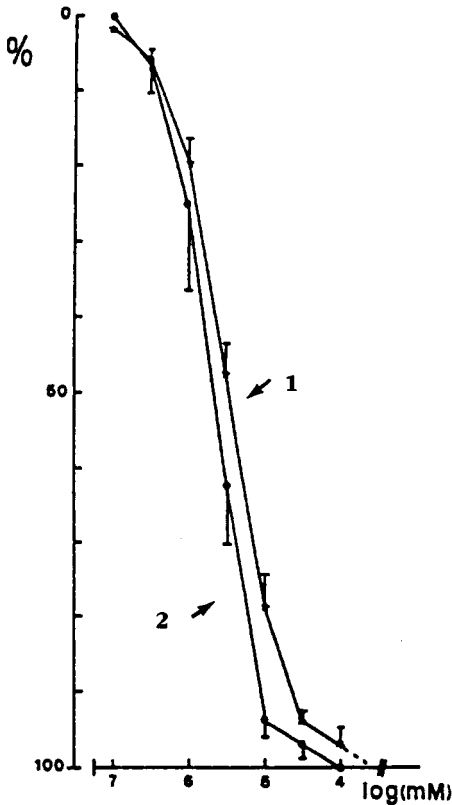


FIGURE 1. Relaxations produites par l'addition de doses cumulatives de chlorhydrate de norstephalagine [1] et du chlorhydrate d'atherospermidine [2] sur le plateau de contraction induit par le KCl (56,3 mM). 1: ($n = 6$) $E_{max} = 99,26 \pm 1,97\%$; $DE_{50} = 3,22 \pm 0,80 \mu M$. 2: ($n = 6$) $E_{max} = 99,15 \pm 2,05\%$; $DE_{50} = 3,54 \pm 0,44 \mu M$.

L'activation de ces récepteurs provoque l'ouverture des canaux calciques et donc l'entrée de calcium dans la cellule. L'addition de doses cumulatives de 1 ou 2 provoque une diminution des contractions rythmiques induites par l'oxytocine ($n = 6$); les doses les plus fortes (1 33 μM ; 2 100 μM) suppriment complètement ces contractions (Figure 2). Aucune différence n'est constatée dans la réponse des produits 1 et 2 à l'égard des contractions induites par l'oxytocine dans un milieu riche en ions calcium. La récupération des contractions après le retrait des alcaloïdes du milieu d'incuba-

tion indique que l'action n'est pas irréversible (Figure 2).

Ces résultats sont très proches de ceux obtenus dans des conditions identiques avec des alcaloïdes du type benzylisoquinoléine (1) et cularine (2), mais ils sont éloignés de ceux obtenus avec des alcaloïdes dimères du type bisbenzylisoquinoléine (1). Les résultats montrent que les produits 1 et 2 ont une activité relaxante du muscle lisse utérin, sans spécificité pour les contractions dépendant du voltage (KCl) ou celles induites par l'activation de récepteurs (oxytocine). Pour savoir si l'action relaxante est due à une diminution de l'entrée du calcium dans la cellule ou à un mécanisme intracellulaire, nous avons fait appel à des expériences dans un milieu dépourvu d'ions calcium.

Lorsqu'on utilise l'oxytocine comme agoniste, dans un milieu dépourvu d'ions calcium (13), la norstephalagine [1] ne réduit pas le plateau de contraction et même les doses les plus fortes induisent une contraction qui s'ajoute au plateau. Ceci pourrait s'expliquer par une libération supplémentaire de calcium intracellulaire. Par contre l'atherospermidine [2] dans les mêmes conditions, réduit de façon dose-dépendante l'amplitude du plateau de contraction induit par l'oxytocine avec une DE_{50} du même ordre que celle obtenue dans les expériences en présence d'ions calcium (Figure 3). Par ailleurs, lorsque le plateau de contraction est induit par le vanadate dans un milieu dépourvu d'ions calcium (13,14), l'addition de 1 provoque des résultats contradictoires; en effet les plus faibles doses relaxent, tandis que les plus fortes doses provoquent une contraction (Figure 4). Pour le produit 2, l'effet obtenu sur le plateau de contraction induit par le vanadate est comparable à celui obtenu sur le plateau induit par l'oxytocine: relaxations dose-dépendantes (Figures 3 et 4).

En ce qui concerne le comportement de la norstephalagine [1] face au plateau de contraction induit par le vanadate

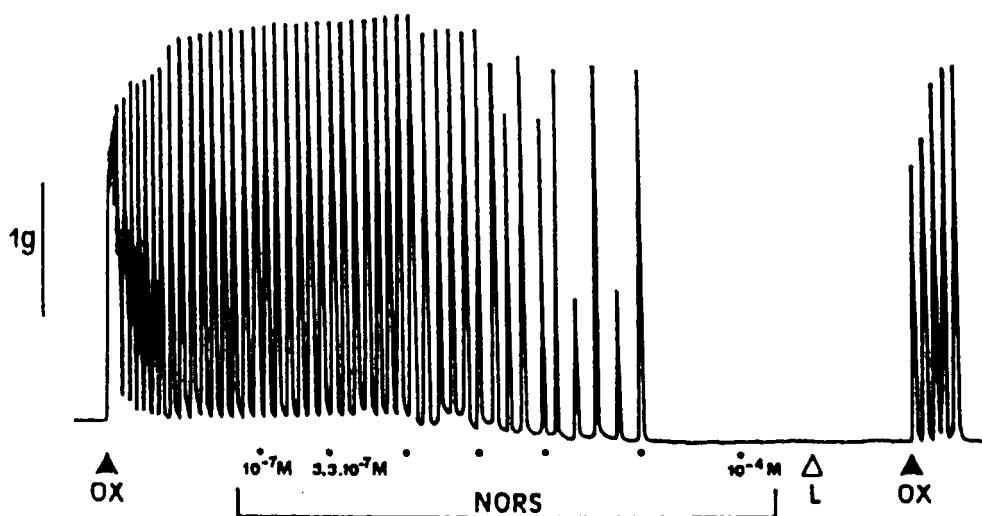


FIGURE 2. Modifications des contractions rythmiques induites par l'oxytocine (OX) 10^{-2} UI/ml dans un milieu riche en calcium, après l'addition de doses cumulatives du chlorhydrate de norstéphanine (NORS). L = lavage.

dans un milieu dépourvu d'ions calcium, il faut signaler que la norstéphanine [1] est une noroporphine qui, en présence d'un oxydant comme le vanadate s'oxyde au moins partiellement, pour former l'oxoaporphine correspondante, l'atherospermidine [2]. Lorsque quelques mg de 1 sont mis en présence d'or-

thovanadate de Na sous agitation à 31° , on constate, par chromatographie-couche-mince, la formation d'atherospermidine [2]). Ceci peut expliquer l'action relaxante de 1 sur le plateau de contraction induit par le vanadate, effet qui n'a pas été observé sur le plateau de contraction induit par l'oxytocine.

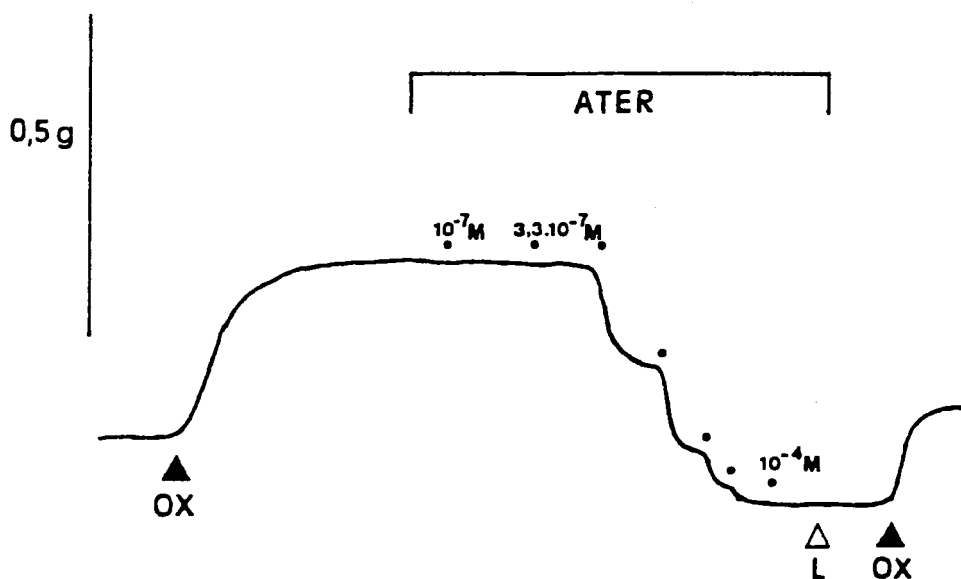


FIGURE 3. Effet de l'addition du chlorhydrate d'atherospermidine (ATER) sur le plateau de contraction induit par l'oxytocine (OX) 10^{-2} UI/ml, après incubation dans un milieu dépourvu de calcium et en présence d'EDTA. 2: ($n = 5$) $E_{max} = 167,23 \pm 13,17\%$; $DE_{50} = 3,38 \pm 0,89 \mu M$.

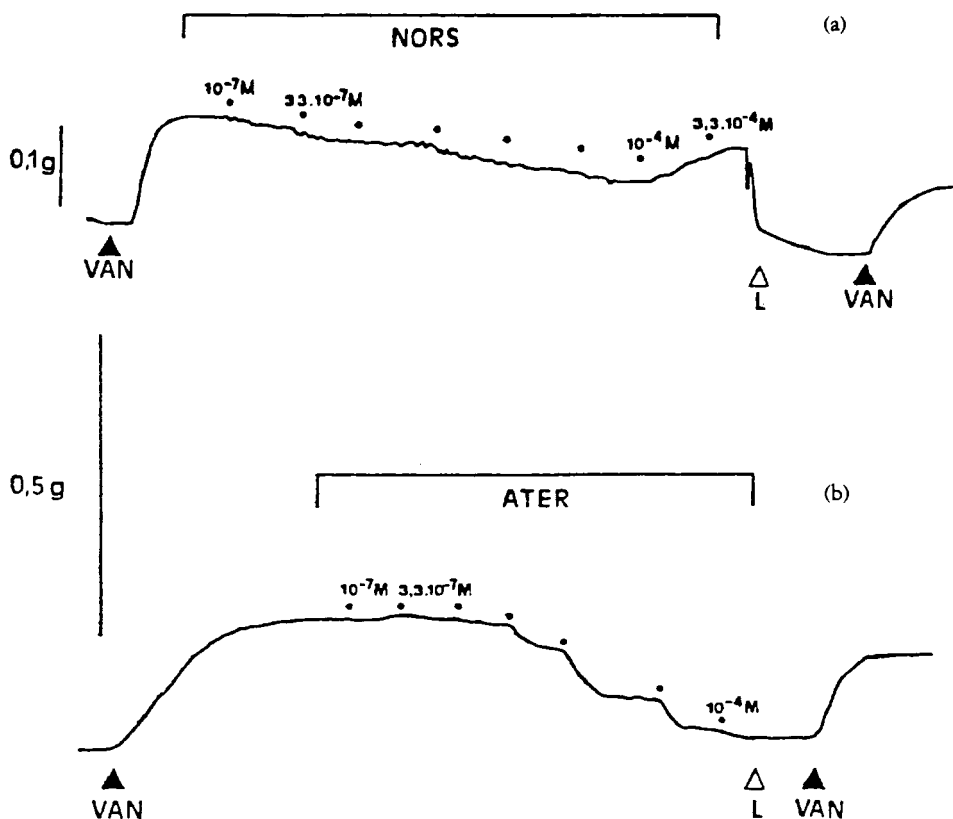


FIGURE 4. Modifications des plateaux de contraction induites par le vanadate (VAN), 80 μ M, dans un milieu dépourvu d'ions calcium, après addition de doses cumulatives de chlorhydrate de norstephalagine (a) et de chlorhydrate d'atherospermidine (b).

Les différences d'activité de **1** et **2** au niveau intracellulaire, peuvent être expliquées par leurs différences structurales: état d'oxydation du cycle pyridinique, différence de basicité, délocalisation électronique, et planéité structurale. La comparaison entre les résultats d'activité obtenus pour les produits **1** et **2** et leurs structures chimiques nous conduit à tirer certaines conclusions: (a) Les deux alcaloïdes inhibent l'entrée du calcium extracellulaire, mais au niveau intracellulaire, ils agissent par des mécanismes différents: la norstephalagine [**1**] ne diminue pas les taux de calcium libre intracellulaire (il y a même une libération du calcium à fortes doses), tandis que l'atherospermidine [**2**] inhibe le calcium intracellulaire. (b) L'état d'oxydation du cycle pyridinique, la délocalisation électronique du squelette

aporphine, et sa faible basicité doivent être les responsables de l'action intracellulaire des oxoaporphines (type atherospermidine [**2**]). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur d'autres types d'isoquinoléines, notamment dans le cas de benzyloisoquinoléines de type paverine (1). (c) La planéité de la structure **2** et la torsion de la structure **1** se traduisent pharmacologiquement par une activité relaxante à la fois plus importante mais moins spécifique de l'atherospermidine [**2**] par rapport à celle de la norstephalagine [**1**].

PARTIE EXPERIMENTALE

ISOLEMENT D'ALCALOÏDES D'*A. MAINGAYI*. — Les écorces de tiges ont été récoltées en Malaisie à 87 km de Kora Tinggi près de Mersing en Novembre 1985. Un échantillon d'herbier est conservé sous la référence K.L. N° 3408 au Museum de l'University of Malaya à Kuala Lum-

pur en Malaisie. Les alcaloïdes totaux (1,55%), obtenus selon des procédés habituels (9), sont séparés par chromatographie d'adsorption sur colonne réalisée sur Kieselgel 60 H (Merck 7736) avec le mélange CH_2Cl_2 -MeOH (96:4); puis purifiés successivement par ccm préparatives.

NORSTEPHALAGINE [1].— $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3$; $[\alpha]_D -37^\circ$; ^1H rmn (250 MHz, Bruker, CDCl_3) δ 4,03 (s, 3H, OMe-3), 5,94 et 6,10 (2d, système AB, O- CH_2 -O), 7,22 (m, 3H, H-8, -9, -10), 8,02 (m, 1H, H-8); ir, sm, et uv voir Guinaudeau *et al.* (15) et Cavé *et al.* (8).

ANONAIN, NORNUCIFERINE, HYDROXY-3 NORNUCIFERINE, ET USHINSUNINE, LIRIODENINE, ET LYSICAMINE.—Voir Guinaudeau *et al.* (15-18).

ATHEROSPERMIDINE [2].— $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{NO}_4$; ^1H rmn (60 MHz, Varian, TFA) δ 4,03 (s, 3H, OMe-3), 6,53 (s, 2H, O- CH_2 -O), 7,43-8,70 (m, 4H, H-8, -9, -10, -11), 8,35 et 8,66 (2d, 2H, H-4, -5, $J = 7$ Hz); ^{13}C rmn, ir, sm, et uv voir Guinaudeau *et al.* (15-18).

PREPARATION DE NORSTEPHALAGINE [1] A PARTIR D'ATHEROSPERMIDINE [2].—A 5 mg de 2 dissous dans 0,5 ml d'un mélange AcOH - H_2O (2:1), sont ajoutés 0,68 g de Zn et 1,5 ml de HCl 10 N. Après une nuit à reflux sous agitation, on alcalinise et on extrait au CH_2Cl_2 . La solution organique est lavée à l' H_2O , séchée sur Na_2SO_4 anhydre, filtrée, et évaporée. La norstephalagine [1] est obtenue quantitativement.

DISCRETAMINE.—Voir Brochmann-Hanssen et Chiang (19).

MATERIEL ET METHODES PHARMACOLOGIQUES.—Animaux, Rats Wistar (170-220 g), traités 24 h auparavant à l'oestradiol (5 mg/kg). Technique, utérus isolé de rats d'après Magnus. Appareils, transducteur isométrique Gould Statham UC2, amplificateur HP 8805, enregistreur Philips PM 8222. Liquides nutritifs, a) Expériences en présence de calcium: Plateau de KCl , Ringer hypocalcique, composition NaCl (154 mM), KCl (5,63 mM), CaCl_2 (0,648 mM), NaHCO_3 (5,95 mM), glucose (2,77 mM); solution dépolarisante (KCl , 56,3 mM). Contractions par l'oxytocine, Krebs-Henseleit; composition, NaCl (154 mM), KCl (5,63 mM), CaCl_2 (2,16 mM), NaHCO_3 (5,95 mM), glucose (2,75 mM). b) Expériences dans un milieu dépourvu d'ions calcium: Plateau d'oxytocine ou vanadate, Ringer-Locke, composition: NaCl (154 mM), KCl (5,63 mM), CaCl_2 (2,16 mM), MgCl_2 (2,10 mM), NaHCO_3 (5,95 mM), glucose (5,55 mM); Ringer-Locke sans calcium: on supprime le CaCl_2 et on ajoute l'EDTA 3 mM. Doses: oxytocine, 10^{-2} UI/ml; vanadate, 80 μM ; norstephalagine et atherospermidine 10^{-7} M, 10^{-6} M, 3,3. 10^{-6} M, 10^{-5} M, 3,3. 10^{-5} , 10^{-4} M.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la "Secretaría de Estado de Universidades e Investigación" du Ministère Espagnol d'Education, pour le financement de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- M.P. D'Ocon, M.L. Cadenas, E. Anselmi, M.C. Zafra-Polo, et D. Cortes, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **297**, 205 (1989).
- R. Blasco, M.P. D'Ocon, M.L. Cadenas, M.C. Zafra-Polo, D. Cortes, M.C. Villaverde, et L. Castedo, "Les curarines: nouveaux relaxants du muscle lisse," 24^{ème} Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique, Strasbourg, 1988.
- M.L. Cadenas, E. Naline, M.P. D'Ocon, D. Cortes, et C. Advenier, *J. Pharm. Pharmacol.*, sous presse.
- R.E. Fries, in: "Die natürlichen Pflanzenfamilien." Ed. par A. Engle et K. Prantl, 2^{ème} ed., Duncker et Humblot, Berlin, 1959, p. 124.
- J. Sinclair, *Garden's Bull. (Singapore)*, **14**, 149 (1955).
- M. Leboeuf, A. Cavé, P.K. Bhaumik, B. Mukherjee, et R. Mukherjee, *Phytochemistry*, **21**, 2783 (1982).
- J. Eloumi-Ropivia, J. Beliveau, et D.Z. Simon, *J. Nat. Prod.*, **48**, 460 (1985).
- A. Cavé, B.K. Cassels, R. Hocquemiller, M. Leboeuf, S. Rasamizafi, F. Roblot, D. Davoust, J.R. Deverre, K.C. Khan, et A.H.A. Hadi, *J. Nat. Prod.*, **49**, 602 (1986).
- M. Leboeuf, D. Cortes, R. Hocquemiller, et A. Cavé, *Planta Med.*, **48**, 234 (1983).
- D.J. Triggler et V.C. Swamy, *Circulation Res., Suppl. I*, **52**, 17 (1983).
- T.B. Bolton, *Physiol. Rev.*, **59**, 606 (1979).
- A. Villar, M.P. D'Ocon et E. Anselmi, *J. Pharmacol.*, **4**, 541 (1986).
- K. Sakai, T. Yamaguchi et M. Uchida, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **250**, 40 (1981).
- E. Anselmi, M.P. D'Ocon et A. Villar, *Prostaglandins*, **34**, 351 (1987).
- H. Guinaudeau, M. Leboeuf, et A. Cavé, *J. Nat. Prod.*, **46**, 761 (1983).
- H. Guinaudeau, M. Leboeuf, et A. Cavé, *Lloydia*, **38**, 275 (1975).
- H. Guinaudeau, M. Leboeuf, et A. Cavé, *J. Nat. Prod.*, **42**, 325 (1979).
- H. Guinaudeau, M. Leboeuf, et A. Cavé, *J. Nat. Prod.*, **51**, 389 (1988).
- E. Brochmann-Hanssen et H.C. Chiang, *J. Org. Chem.*, **42**, 3588 (1977).

Received 25 July 1989