

ETUDE DES CULTURES DE TISSUS DE *VINCA MINOR* ISOLEMENT D'UN LIGNANE, LE LIRIORESINOL B.

JANINE GARNIER, NICOLE KUNESCH, EMMANUEL SIOU et JACQUES POISSON

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (Equipe de recherche associée au C.N.R.S. no. 317),
U.E.R. de Chimie Thérapeutique de l'Université de Paris-Sud, Rue J. B. Clément, 92290 Chatenay-Malabry, France

GERHARD KUNESCH

Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S., 91190 Gif/Yvette, France
et

MICHEL KOCH

Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

(Reçu 28 juillet 1974)

Key Word Index—*Vinca minor*, *V. major* var. *variegata*, Apocynaceae; tissue culture; lignan; lirioresinol B.

Abstract—Tissue cultures of *Vinca minor* contain only small amounts of alkaloids and vincamine, the major alkaloid of *V. minor* plants, is not detectable at all. A lignan-lirioresinol B- is shown to be the major constituent of *V. minor* and *V. major* var. *variegata* tissue cultures.

Résumé—Nous avons pu montrer que les cultures de tissus de *Vinca minor* ne contenaient que des quantités très faibles d'alcaloïdes. La vincamine, alcaloïde principal de cette plante n'est pas synthétisée *in vitro*. Le composé majoritaire isolé est un lignane, le lirioresinol B. Il a également été identifié dans les tissus de *Vinca major* var. *variegata*.

INTRODUCTION

Nous nous sommes intéressés aux cultures de tissus de *Vinca minor*, dont la plante entière renferme deux alcaloïdes majoritaires: la vincamine et la vincine [1]. Deux séries d'expériences ont été réalisées: administration de DL-tryptophane ^{14}C -2 à des cultures de tissus de *Vinca minor* dans le but de mettre en évidence la formation de vincamine radioactive [2] et extraction d'une quantité importante de tissus mis en culture pendant deux ans.

Au cours de notre travail, nous avons eu connaissance de publications de Petiard et Demarly [3], qui ont étudié les cultures de tissus de *Vinca minor* provenant de souches analogues aux nôtres et réalisées dans des conditions identiques. D'après les chromatogrammes en couche mince (solvant B), ils ont indiqué la présence de vincamine dans les cultures de tissus de *Vinca minor* et supposé pour ceux-ci une composition identique à celles des feuilles de la même espèce.

RESULTATS ET DISCUSSION

Deux expériences ont été effectuées. Dans la première, l'extrait brut obtenu à partir des cals de tissus mis en présence de DL-tryptophane ^{14}C -2 a été soumis à une chromatographie en couche mince suivie d'un comptage direct sur plaque. Aucune radioactivité n'a pu être détectée, excepté à l'endroit du dépôt. Dans la seconde expérience, nous avons ajouté à l'extrait brut précédent une quantité connue (1 mg) de vincamine et (0,4 mg) de vincine comme entraîneurs. Par comptage direct sur plaque, aucune trace de radioactivité n'a pu être décelée au niveau de la vincamine et de la vincine.

Ces résultats négatifs ne pouvaient cependant pas prouver formellement l'absence de vincamine dans les cultures de tissus de *V. minor*. C'est pourquoi nous avons effectué une nouvelle extraction en partant, cette fois, d'une quantité importante de tissus: 8 kg de tissus frais obtenus au long de deux

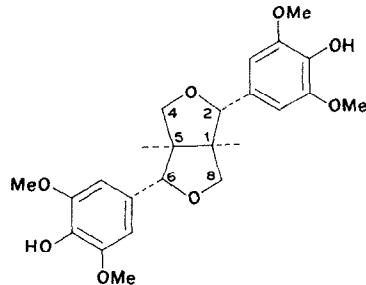
années de culture et lyophilisés ont été extraits de manière habituelle. Deux fractions chloroformiques ont été obtenues: l'une 1 (3 g), après extraction en milieu chlorhydrique, l'autre 2 (100 mg) après alcalinisation.

La fraction 2 (100 mg), censée contenir les substances basiques, chromatographiée sur plaque avec plusieurs solvants dont le solvant B [3], montre, après révélation au réactif de Dragendorff, de faibles traces de produits très polaires, mais ne présente aucune tache ayant un R_f voisin de celui de la vincamine déposée comme témoin. Le résidu de 1, soumis à une chromatographie sur plaque avec le même solvant B et révélation au réactif de Dragendorff, montre des produits de R_f analogues à ceux de la vincamine comme l'ont décrit [3], mais s'en diffèrentient cependant après révélation au sulfate cérique.

Après purification de la fraction 1 par chromatographies répétées sur colonne et sur plaques, deux composés **1** et **2** ont pu être isolés. Malgré une réaction positive au réactif de Dragendorff, **1** ($F = 175-186^\circ$) n'est pas un alcaloïde comme le montre l'analyse centésimale en $C_{22}H_{26}O_8$ ($M = 418$). Les spectres UV [λ_{max} nm. (log ϵ): 239 (4,12), 272 (3,40) et 282 (3,24)] et IR [KBr γ cm $^{-1}$: 3300 (OH), 1610 (Ph)] et, plus particulièrement, la fragmentation observée dans le spectre de masse, ainsi que l'analyse du spectre de R.M.N., ont permis d'attribuer au composé **1**, la structure du lirioresinol B, lignane isolé du *Liriodendron tulipifera* [4]. Cette structure a été confirmée par comparaison avec les données de la littérature [5, 6]. La configuration diéquatoriale des centres 2 et 6 est établie sans ambiguïté d'après le spectre de R.M.N. grâce à la résonance à champ plus bas des protons en 4 et 8 [$(\delta 4,18-4,43$ ppm et $3,8-4,08$ ppm)] ainsi que par la position du doublet de H-2 et H-6 ($\delta 4,75$ ppm) caractéristiques de cette configuration [5-8].

Le composé **2**, isolé à l'état de traces, présente en spectrométrie de masse une fragmentation identique à celle de **1** ($M^+ \text{ à } m/e = 418$) et un spectre UV identique. La faible quantité isolée ne nous a pas permis de préciser sa structure. On peut cependant affirmer qu'il ne s'agit pas là non plus de vin-

camine, mais vraisemblablement d'un isomère du lirioresinol B.



(1) Lirioresinol B

En conclusion, le composé majoritaire (0,01%) isolé ici des cultures de tissus de *Vinca minor* L. est un lignane, le lirioresinol B, alors que seuls de faibles traces d'alcaloïdes ont pu être détectées. Le lirioresinol B présente une grande analogie de comportement en chromatographie sur couche mince avec la vincamine, alcaloïde majoritaire des feuilles de *Vinca minor* par sa réaction inattendue avec le réactif de Dragendorff et par son R_f très voisin avec les trois solvants différents utilisés. Il s'en différencie cependant par révélation à l'aide du réactif cérique, ou par des migrations répétées dans chacun de ces solvants. Sa présence constitue donc une source d'erreur pour la caractérisation de la vincamine dans les cultures de tissus de *Vinca minor*.

Un essai analogue a été effectué sur des cultures de *Vinca major* var. *variegata*. Le résidu 2 (30 mg) a montré après chromatographie sur plaque la présence de faibles quantités de substances révélées par le réactif de Dragendorff. Le résidu 1 (100 mg) plus important a permis d'isoler en faible quantité deux composés dont l'un a été identifié au lirioresinol B précédemment isolé. La présence de lirioresinol dans les cultures de *Vinca minor* n'apparaît donc pas comme un phénomène isolé.

PARTIE EXPERIMENTALE

*Culture des tissus.** Des tiges de *Vinca minor* L. de deux origines géographiques différentes ont été mis en culture suivant la technique usuelle sur milieu de Heller contenant des microéléments de Heller, $5 \cdot 10^{-7}$ d'ANA† et 20% de lait de coco ajouté au moment de la mise en culture. Les premiers tests sur ces deux souches ont été effectués avec des cals transplantés sur milieu ne contenant plus que 2 à 5% de lait de coco. Ils ont révélé une composition chimique identique pour les deux souches. Le travail a donc été poursuivi seulement sur l'une d'elles, alors âgée de 12 mois. L'accumulation du matériel nécessaire a été effectuée sur un laps de temps de l'ordre de 2 ans. La mise en culture

* Les cultures de tissus ont été effectuées par l'une d'entre nous J.G. dans le laboratoire de Monsieur G. Morel, au C.N.R.A. de Versailles.

† ANA: acide naphtalène acétique.

de *Vinca major* var. *variega* Loudon a été effectuée de façon identique.

Expériences d'incorporation. 50 cals ont été mis en contact pendant 4 hr avec 30 ml de solution nutritive contenant 50 µCi de DL-tryptophane indole -2¹⁴C. Les cals ont été alors lavés à l'eau puis traités à l'azote liquide avant d'être broyés dans un mortier avec du sable. La poudre obtenue a été alcalinisée avec NH₄OH à 10%, puis épousée avec de l'éther dans un Soxhlet. La phase éthérrée est extraite par HCl à 3% et la phase aqueuse acide alcalinisée par NH₄OH et extraite trois fois avec CHCl₃. Après séchage, l'extrait chloroformique a été évaporé à sec. La radiochromatographie en couche mince (plaques de Kieselgel Merck MF 254); solvant C₆H₁₂-Me₂CO-MeOH (48:50:2), compteur Dunnschicht-Scanner Berthold) a été réalisée: (a) par comptage direct du chromatogramme; (b) après dilution de l'extrait avec 1 mg de vincamine et 0,4 mg de vincine et comptage sur le chromatogramme.

Une deuxième incorporation a été effectuée sur 50 cals mis en contact 24 hr avec la solution nutritive radioactive. Les résultats obtenus dans les deux essais, soit par comptage direct, soit après dilution avec la vincamine et la vincine sont identiques et ne montrent aucune radioactivité à l'endroit des deux alcaloïdes.

Extraction des cultures de tissus. 8 kg de tissus frais, pesant 760 g après lyophilisation, ont été broyés et percolés avec EtOH à 90°. Après concentration de l'extrait, un partage a été effectué entre C₆H₁₄ et MeOH-H₂O (3:1). La phase méthanolique évaporée et reprise à l'eau a été acidifiée avec HCl 3 N et extraite avec CHCl₃. La phase chloroformique a fourni après séchage et évaporation, 3 g d'un résidu 1. La phase aqueuse, après alcalinisation et extraction avec CHCl₃, a fourni un résidu 2 (100 mg). Le résidu 1 a été dissous dans C₆H₆ et la solution benzénique filtrée sur 20 g de silice Merck d'activité 2 avec deux solvants l'éther et MeOH. L'éluat éthérré, contenant des graisses, a été éliminé. L'extrait méthanolique pesant 1,100 g a été chromatographié sur 12 g de silice Merck d'activité 2 en éluant avec l'éther, puis MeOH. Les fractions élues à l'éther ont été réunies et après recristallisation dans un mélange

MeOH-Et₂O, ont fourni 36 mg de liriorésinol B 1. Les fractions élues par MeOH ont également été réunies (180 mg) et après purification sur plaques de Kieselgel HF 254 Merck avec le solvant CHCl₃-MeOH (96:4) ont fourni 10 mg de liriorésinol B 1 et 8 mg de 2.

Liriorésinol B 1 (voir également le texte): Spectre de masse: *m/e* (%): 418 (100, M⁺), 387 (5), 251 (5), 236 (7), 235 (10), 226 (7), 221 (8), 210 (16), 208 (12), 203 (8), 193 (10), 192 (26), 183 (15), 182 (30), 181 (60), 180 (16), 168 (15), 167 (55), 161 (17), 155 (9), 154 (19), 151 (6). Spectre de R.M.N.: (CDCl₃) δ ppm: 3,10 (*m*, 1 p), 3,8-4,08 (*m*, 2 p), 3,9 (s, 3 p), (Ar-OCH₃), 4,18-4,43 (*m*, 2 p), 4,75 (*d*, J_{HH} 4 Hz, 1 p), 5,56 (s, 1 p-ArOH), 6,6 (s, 2 p).

Produit 2. UV λ_{max} nm: 239, 272, 282 (épaulement). Spectre de masse: *m/e* (%): 418 (25, M⁺), 236 (7), 235 (11), 210 (22), 208 (7), 193 (12), 182 (15), 181 (45), 180 (21), 168 (20), 167 (100), 161 (12), 155 (15), 154 (18).

Remerciements—Nous tenons à remercier Le Professeur M.-M. Janot pour L'Intérêt Qu'il a Forté à ce Travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. Taylor, W. I. et Farnsworth, N. R. (1973) in *The Vinca Alkaloids* [Dekker, M. ed.] New York.
2. Kutney, J. P., Beck, J. F., Nelson, V. R. et Sood, R. S. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 255.
3. (a) Petiard, V. et Demarly, Y. (1972) *Ann. Amelior. Plantes* **22**, 361; (b) Petiard, V., Demarly Y. et Paris, R. R. (1972) *Plant. Med. Phytother.* **6**, 41.
4. Dickey, E. E. (1958) *J. Org. Chem.* **23**, 179.
5. Briggs, L. H., Cambie, R. C. et Couch, R. A. F. (1968) *J. Chem. Soc. (C.)*, 3042.
6. Russell, G. B. et Fenemore, P. G. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1799.
7. Birch, A. J., MacDonald, P. L. et Pelter, A. (1967) *J. Chem. Soc. (C.)*, 1968.
8. Atal, C. K., Dhar, K. L. et Pelter, A. (1967) *J. Chem. Soc. (C.)*, 2228.