

ALCALOÏDES DIHYDROFUROQUINOLEIQUES DE QUELQUES RUTACEAE: ISOLEMENT, STRUCTURE, PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

MARC RIDEAU*, CATHERINE VERCHÈRE†, PATRICK HIBON*, JEAN-CLAUDE CHÉNIEUX*, PHILIPPE MAUPAS* et CLAUDE VIEL†

* Faculté de Pharmacie, 2 bis Boulevard Tonnellé, 37000 Tours; † Centre d'Etudes et de Recherches de Chimie Organique Appliquée (C.E.R.C.O.A.), 2-8, rue Henry Dunant, 94320 Thiais, France

(Révisé reçu le 24 février 1978)

Key Word Index—*Choisya ternata*; *Ptelea trifoliata*; *Ruta graveolens*; Rutaceae; furoquinoline alkaloids; cytotoxic activity; bactericidal activity; growth inhibitory properties.

Abstract—Six dihydrofuroquinoline quaternary bases have been isolated from *Choisya ternata*, *Ptelea trifoliata* and *Ruta graveolens*. Their structures have been determined by spectrometry and for some, the absolute configuration is reported. Some of the six isolated alkaloids have a prominent cytotoxic action on plant and animal tumor cells, and an inhibitory effect on Gram-positive bacteria.

INTRODUCTION

Nous avons isolé à partir des feuilles de *Choisya ternata* H. B. et K. et de *Ptelea trifoliata* L. sous-espèce *trifoliata*, var. *trifoliata* Bailey [1, 2], deux inhibiteurs de la prolifération de culture *in vitro* de tissus végétaux. Ils ont été identifiés à des bases quaternaires dihydrofuroquinoléiques, sels de balfourodinium dans la première espèce et de pteleolonium dans la seconde [3-5]. Au cours de la purification de ces substances, d'autres bases en plus faible quantité ont été également cristallisées, et certaines ont été étudiées dans une note préliminaire [5]. Par ailleurs, pour une étude des propriétés biologiques, nous avons obtenu à partir des feuilles de *Ruta graveolens* L. les sels de platydesminium et de ribalinium déjà isolés dans cette même espèce [6, 7].

Dans cet article, nous reportons: l'identification des bases mineures cristallisées de *C. ternata*; les résultats de la spectrographie de masse des sels de furoquinoléiques.

lénium 1 et 2 (perchlorates et chlorures de la série α -hydroxyisopropylée 1, perchlorates de la série isopropénolée 2); l'activité inhibitrice de la croissance de certains de ces composés vis-à-vis de divers tests sur cellules végétales, animales et bactériennes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Isolement et structures

Les bases dihydrofuroquinoléiques suivantes ont été cristallisées et identifiées par l'étude de leurs spectres UV, de RMN et de masse: le (−)(S) balfourodinium 1a et le (−)(S) platydesminium 1b à partir des feuilles, racines et tiges de *C. ternata*; le (−)(S) hydroxyluninium 1d, le (+) pteleolonium 2a et le (+) isopteleolonium 2b dans les feuilles de *P. trifoliata*; le (+)(R) ribalinium 1e et le (+)(R) platydesminium 1c dans les feuilles de *R. graveolens*.

Le signe du pouvoir rotatoire des sels des deux premières bases nous a permis, à partir des travaux de Grundon *et al.* [8] d'en déduire leur configuration absolue. Ils sont isolés pour la première fois: jusqu'alors, seuls les antipodes optiques de configuration *R* étaient connus chez d'autres Rutaceae. La présence de platydesminium chez *C. ternata*, *R. graveolens* [6, 7] (Rutoidae) et chez *Skimmia japonica* [9] et *Araliopsis tabouensis* [10] (Toddiolioïdæ); celle de balfourodinium chez *C. ternata* et chez une Toddiolioïdæ: *Balfourodendron riedelianum* [11] conduisent à admettre avec Waterman [10, 12] l'existence de liens chimiques entre les Toddiolioïdæ et quelques genres de Rutoidae. Il reste cependant à connaître les différences de biogénèse entre les isomères optiques de chacun des alcaloïdes isolés, et la signification taxonomique de leur présence dans la plante. Le (−)(S) hydroxyluninium 1d et le (+) pteleolonium 2a ont déjà été isolés chez *P. trifoliata* [13], mais le (+) isopteleolonium 2b est un alcaloïde nouveau. Sa quinolone-2 a toutefois été mise en évidence dans les fruits de cette espèce [14].

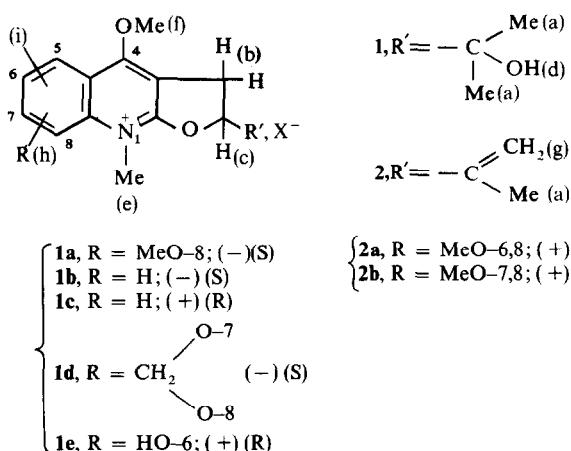


Fig. 1.

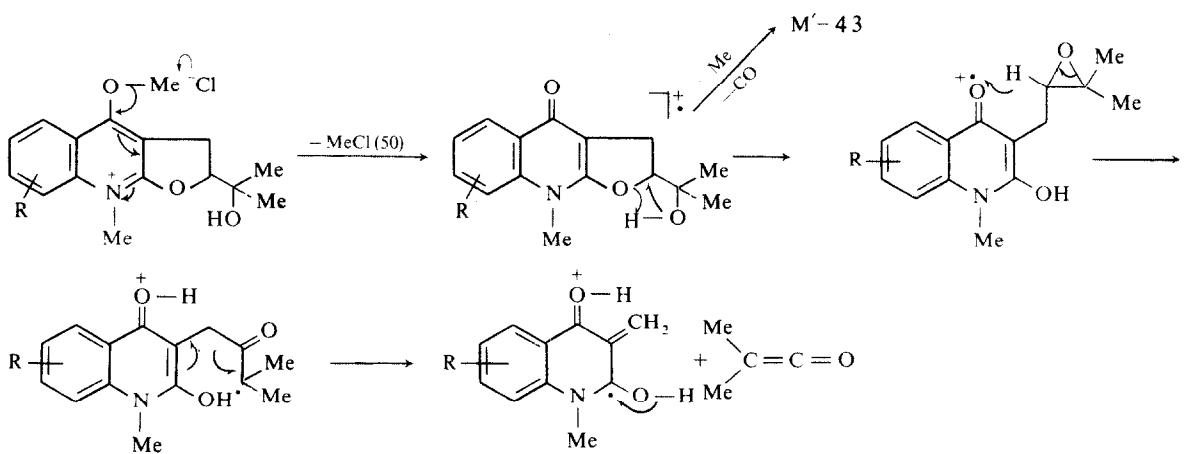


Fig. 2

Pour tous les alcaloïdes isolés, les valeurs des maximums d'absorption en UV, ainsi que celles des coefficients d'absorption moléculaires qui y sont attachés sont en excellente concordance avec les données rapportées pour les structures de ce type. Il en est de même pour les valeurs des déplacements chimiques et des couplages observés en RMN pour les divers protons des chlorures et des perchlorates étudiés.

La spectrographie de masse des perchlorates des séries α -hydroxyisopropylée (**1a–1e**) et α -isopropényle (**2a**, **2b**) n'avait pas été réalisée, et la littérature ne signale que quelques structures d'ions pour les chlorures de la série **1** [13, 15]. Des données que nous avons obtenues avec les chlorures des dérivés de type **1**, il ressort les principales fragmentations suivantes: $M^{+} = (M-\text{CH}_3-\text{Cl})^{+}$; $M-43$; $M-59$; $M-70$; $M-71$ (100%). Différents

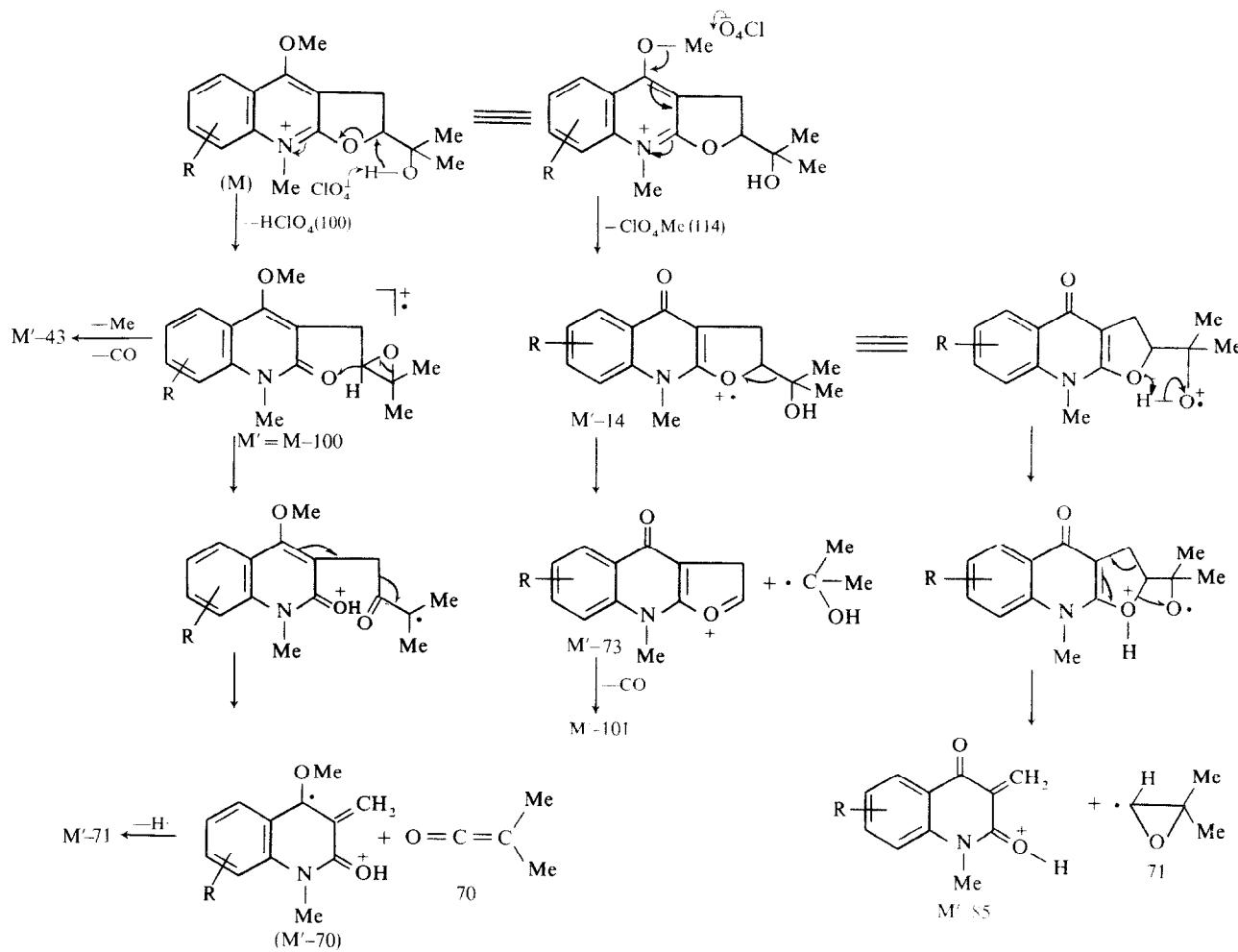


Fig. 3. Fragmentations des perchlorates de dihydrofuroquinoléinium de type 1.

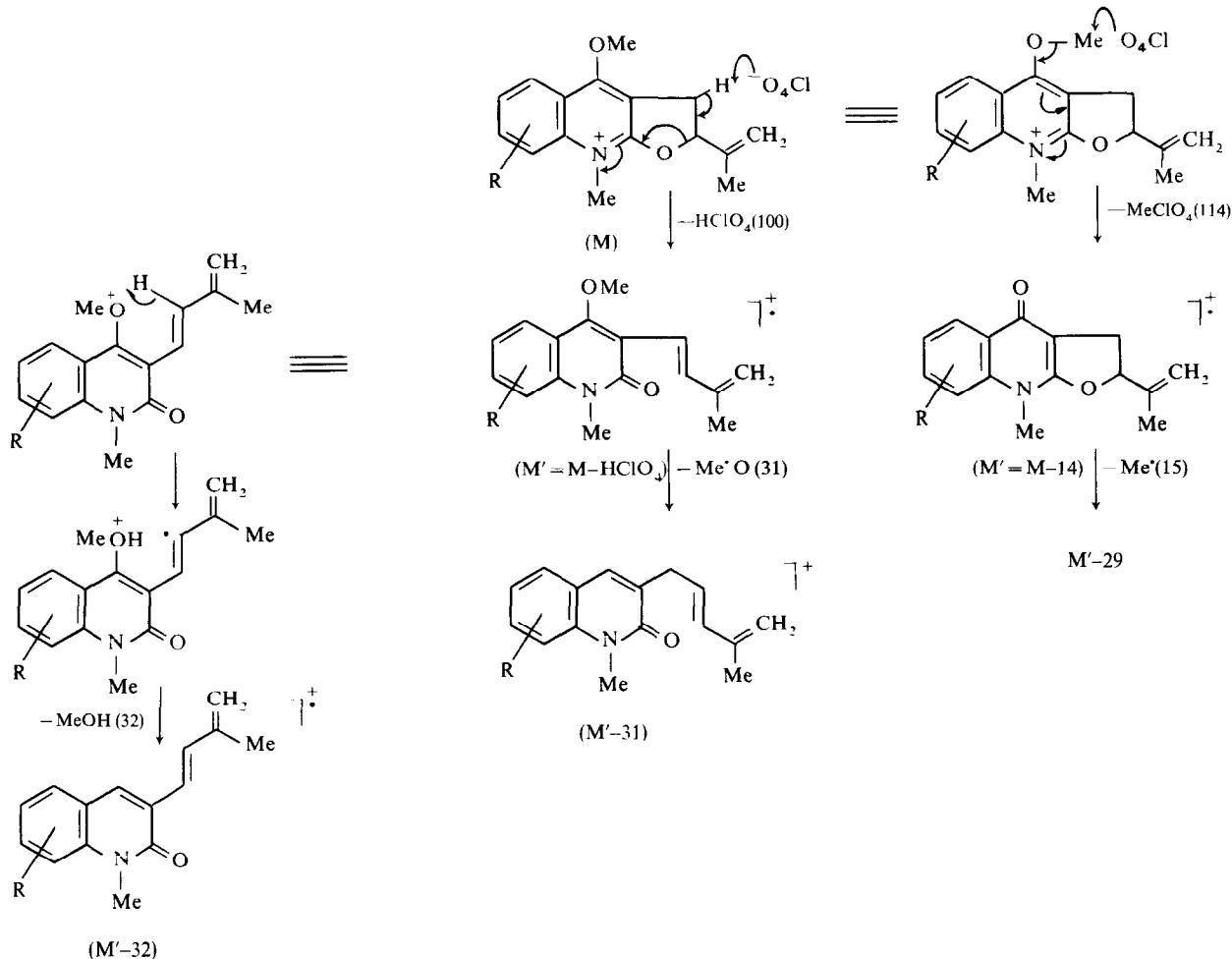


Fig. 4. Fragmentations des perchlorates dihydrofuroquinoléinium de type 2.

mécanismes de fragmentation ont été indiqués pour la formation des ions $M' - 59$ et $M' - 71$ [13, 15, 16]. Nous complétons ces données en proposant le schéma suivant pour la formation de l'ion $M' - 70$ (Fig. 2).

Pour les perchlorates, nous trouvons les principales fragmentations suivantes pour les dérivés de type 1: $M'^{+} = (M - HClO_4)^{+}$; $M' - 43$; $M' - 70$; $M' - 71$ (100%); $M' - 85$; $M' - 101$; pour les dérivés de type 2: $M'^{+} = (M - HClO_4)^{+}$; $M' - 14$; $M' - 29$ (100%); $M' - 31$; $M' - 32$. Les schémas de fragmentation que nous proposons pour ces deux types de sels sont reportés sur les Figs. 3 et 4.

Activité biologique

Des solutions aqueuses de chlorure de (+) ptelefolonium 2a inhibent l'allongement de segments de coléoptiles de blé (DE_{50} : 3.10^{-5} M), retardent la germination des graines de tomate et inhibent le développement des plantules de tomate et de pois. Elles montrent une nette activité inhibitrice vis-à-vis de la croissance de cultures *in vitro* de tissus végétaux: explantats de tissus normaux de topinambour (DE_{50} : 6.10^{-6} M), de tissus tumoraux (Crown-gall) de vigne-vierge (DE_{50} : 5.10^{-6} M). Le chlorure de (-) balfourodinium 1a est également actif sur ces mêmes tests à des concentrations légèrement supérieures (DE_{50} coléoptiles: 10^{-4} M; topinambour: 4.10^{-5} M; Crown-gall: 2.10^{-5} M). Vis-à-vis

de la croissance des explantats de topinambour, l'action inhibitrice de cette substance dépend du moment de son incorporation au milieu de culture: la prolifération des tissus n'est inhibée que si l'alcaloïde est mélangé au milieu en même temps que l'auxine utilisée pour la croissance. Si on procède à la culture de l'explantat pendant 5 jours en présence d'auxine, puis qu'après ce temps on enlève l'auxine et ajoute l'alcaloïde, on ne constate plus d'inhibition. Les sels de (+) ribalinium 1e et de (-) platydesminium 1b sont inactifs à 10^{-3} M.

L'action au niveau de la cellule végétale de certains sels de dihydrofuroquinoléinium peut être rapprochée des propriétés régulatrices des ammoniums quaternaires trouvées par divers auteurs [17, 18]. Des expériences préliminaires nous ayant montré que le chlorure de (-) (S) balfourodinium 1a peut inhiber la prolifération tissulaire de fragments de tiges de *C. ternata* cultivées *in vitro*, bien que toutefois à concentrations assez importantes (10^{-3} M). Ceci pourrait être l'indice d'un rôle de cette substance pour la croissance des tissus qui la produisent.

Le chlorure de (+) ptelefolonium 2a possède par ailleurs une cytotoxicité marquée, comparable à celles du fluoro-5 uracile, du cycloheximide et du β -méthyl β -nitrostyrène [19] vis-à-vis des cellules rénales de Singe, des cellules tumorales K.B. (DE_{50} : 10^{-5} M) et des cellules diploïdes humaines Wi 38 (DE_{50} : 3.10^{-5} M).

L'indication d'une activité antitumorale possible de certains sels de quinoléinium a été donnée par Plakogiannis *et al.* [20], ces auteurs montrant l'action favorable de l'iode de triméthyl-1,2,6 quinoléinium pour la survie de souris atteintes de leucémie L 1210. Là encore, le caractère quaternaire de ces composés est sans doute responsable d'une partie de l'activité biologique, la surface des cellules tumorales possédant une charge négative supérieure à celle des cellules normales par suite d'un excès d'acide sialique cellulaire [21].

Nous avons recherché une activité antimicrobienne du chlorure de (+) ptelefolonium **2a** à la suite des observations de Lucas *et al.* [22] et de l'isolement par Mitscher *et al.* [13] d'une substance faiblement bactéricide, le chlorure de pteleatinium, dans les extraits de *P. trifoliata*. Nous n'avons pas retrouvé cet alcaloïde dans nos extraits. Le chlorure de ptelefolonium **2a** présente une activité non négligeable sur les bactéries Gram (+): *Staphylococcus aureus* et *epidermidis*, *Streptococcus D*: l'action débute à 10^{-4} M et est totale à 10^{-3} M. Il n'est pas actif sur *Saccharomyces boulardii*, et quelques expériences nous ont montré l'absence d'activité antivirale.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion instantanée ont été pris sur banc Kofler; *les pouvoirs rotatoires* ont été mesurés dans MeOH à 20°, la rai D du sodium, à 589 nm, ayant été utilisée. Les concentrations sont exprimées en g/ml; *les spectres de masse* ont été enregistrés avec une énergie d'ionisation de 70 eV, et une température de source de 150 à 250°; *les spectres UV* ont été réalisés en solution aqueuse; *les spectres de RMN* ont été enregistrés à 60 MHz, en utilisant le DMSO_d₆ comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm.

(a) *Méthode d'analyse*. Les organes végétaux ont été prélevés sur des arbustes cultivés au Jardin Botanique de la Faculté de Pharmacie de Tours. Ces bases quaternaires ont été isolées selon la méthode décrite précédemment [3, 4]. Elles sont précipitées par HClO_4 (solv aq. à 65%) ou par l'acide picrique (solv aq. sat.). Les sels sont dissous dans MeOH. La solution est passée sur colonne d'Amberlite IRA 400 (Cl^-) et l'élution est effectuée par MeOH. Chlorures et perchlorates ont été recristallisés dans MeOH-Et₂O.

A partir des feuilles, des tiges et des racines de C. ternata, 2 bases ont été isolées:

(-) (S) *balfourinum* (**1a**): *chlorure*: F 184-185°; $[\alpha]_D$ -15,30° (c, 0.02); *RMN*: *, δ: a: 1.22 (s) et 1.35 (s) (6 H), b: 3.93 (d, $J = 8$ Hz) (2 H), c: 5.25 (t, $J = 8$ Hz) (1 H), d: †, e: 4.48 (s) (3 H), f: 4.25 (s) (3 H), h: 4.03 (s) (3 H), i: 7.68 (m) (3 H); *MS*: *m/e*: 289 (98.1), 246 (49.7), 230 (46.0), 219 (27.6), 218 (100), 217 (49.1), 164 (27.6), 148 (41.1); *UV*: identique à celui du ClO_4^- de (+) (R) [11]; *perchlorate*: F 200-204°, $[\alpha]_D$ -14,64° (c, 0.014); *MS*: 303 (16.5), 260 (75.2), 233 (73.6), 232 (100), 218 (69.4), 202 (39.7), 201 (21.5), 148 (26.4); *UV*: identique à celui du ClO_4^- de (+) (R) [11].

(-) (S) *platydesminium* (**1b**): *perchlorate*: F 180°; $[\alpha]_D$ -24,30° (c, 0.011); *UV, RMN* et *MS*: voir ci-après: (+) (R) *platydesminium*.

* Pour la correspondance entre les lettres et le type de protons, se reporter à la Fig. 1.

† Proton déplaçable par D₂O et variable d'un spectre à l'autre selon les conditions utilisées.

‡ Signal masqué par les méthoxyles.

§ On voit un massif à 5,17 ppm duquel il est difficile de distinguer un triplet. Le spectre obtenu ne permet pas de conclure quant à l'enchaînement furannique.

|| Milieu de culture fourni par l'Institut Pasteur de Paris.

Les feuilles et les fruits de P. trifoliata contiennent principalement:

(-) (S) *hydroxyluninium* (**1d**): *chlorure*: F 225°; (13): 133-135°; $[\alpha]_D$ -15,60° (c, 0.01), [13]: -17,5°; *UV*: identique à litt. [13]; *perchlorate*: F 176-178°; *RMN*: *, δ: a: 1.20 (s) et 1.33 (s) (6 H), b: 3.84 (d, $J = 8$ Hz) (2 H), c: 5.20 (t, $J = 8$ Hz) (1 H), d: †, e: 4.43 (s) (3 H), f: 4.10 (s) (3 H), h: 6.31 (s) (2 H), i: A = 7.76, B = 7.31, J_{AB} = 8 Hz (2 H); *MS*: *m/e*: 317 (4.9), 274 (27.4), 270 (17.1), 247 (50.0), 246 (100), 232 (22.0).

(+) *ptelefolonium* (**2a**): *chlorure*: F 135°; [13]: 94-96°; $[\alpha]_D$ +15,28° (c, 0.006); *perchlorate*: F 254-256°; *RMN*: *, δ: a: 1.83 (s) (3 H), b: 3.87 (d, $J = 8$ Hz) (2 H), c: 5.83 (t, $J = 8$ Hz) (1 H), d: †, e: 4.48 (s) (3 H), f: 4.22 (s) (3 H), g: 5.17 (s) et 5.33 (s) (2 H), h: 3.93 (s) et 4.02 (s) (6 H), i: 7.20 (s) (2 H); *MS*: *m/e*: 315 (51.8), 301 (56.6), 300 (56.6), 286 (100), 285 (37.3), 284 (98.8), 283 (96.4), 274 (47.0), 268 (33.7), 256 (39.8), 252 (41.0), 242 (36.1), 236 (56.6).

(+) *isoptelefolonium* (**2b**): *perchlorate*: F 146-148°; $[\alpha]_D$ +9,83° (c, 0.006); *RMN*: *, δ: a: 1.83 (s) (3 H), b: †, c: 5.80 (t, $J = 8$ Hz) (1 H), d: †, e: 4.40 (s) (3 H), f: 4.17 (s) (3 H), g: 5.11 (s) et 5.26 (s) (2 H), h: 4.00 (s) et 3.85 (s) (6 H), i: A = 7.96, B = 7.52, J_{AB} = 9 Hz (2 H); *MS*: *m/e*: 315 (37.5), 301 (50.0), 286 (90.0), 284 (82.5), 283 (100), 256 (42.5); *UV*: λ_{max} : 219, 254, ~309, 327 nm.

Des feuilles de R. graveolens ont été isolés les:

(+) (R) *ribalinium* (**1e**): *perchlorate*: F 205°; [16]: 218-220°; $[\alpha]_D$ +23,60° (c, 0.006); *RMN*: *, δ: a: 1.22 (s) et 1.33 (s) (6 H), b: 3.88 (d, $J = 8$ Hz) (2 H), c: 5.17 (t, $J = 8$ Hz) (1 H), d: †, e: 4.40 (s) (3 H), f: 3.98 (s) (3 H), h: 10.08 (s) (1 H), i: massif centré sur 7.67 (3 H); *MS*: *m/e*: 289 (6.1), 246 (46.9), 219 (75.5), 218 (100), 204 (46.9), 203 (42.9), 202 (34.7), 188 (59.2); *UV*: identique à litt. [16, 23].

(+) (R) *platydesminium* (**1e**): *chlorure*: F 192-196°; [6, 23]: 108-111°; *MS*: *m/e* 259 (45.8), 226 (25.4), 216 (30.5), 200 (33.9), 189 (40.7), 188 (100); *RMN*: *, δ: a: 1.20 (s) et 1.33 (s) (6 H); b et c: §, d: †, e: 4.47 (s) (3 H), f: 4.02 (s) (3 H), i: 7.60-8.25 (m) (4 H); *UV*: identique à celui du perchlorate reporté par [9]; *perchlorate*: F 200-203°; [9]: 200-202°; $[\alpha]_D$ +16,20° (c, 0.005), [9]: +33°; *MS*: *m/e*: 273 (6.2), 230 (41.7), 203 (85.4), 202 (100), 188 (43.7), 172 (29.2); *UV*: identique à celui du perchlorate reporté par [9].

(b) *Tests biologiques*. Des tissus de parenchyme tubérisé de rhizomes de topinambour (var. violet de Rennes) ou de Crown-gall de vigne-vierge ont été cultivés *in vitro* selon les techniques classiques [24]. Pour les explantats de topinambour, l'auxine utilisée pour la croissance est l'acide indolyl-3 acétique à 3.10^{-7} g/ml.

Les tests 'disque de topinambour' ont été réalisés selon [25], et ceux de croissance de 'segments de coléoptiles de blé' selon [26]. Les tests de germination ont utilisé des graines de tomate (var. Marmande) et de pois.

La cytotoxicité a été étudiée sur cellules animales et humaines cultivées sur milieux à l'hydrolysat de lactalbumine à base Earle]. L'action antimicrobienne et antifongique a été recherchée sur *Escherichia coli* (0111 B₄), *Staphylococcus aureus* et *epidermidis*, *Streptococcus D*, *Salmonella paratyphi A* et *B*, et *S. typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* (cult. 37°, 24 hr).

BIBLIOGRAPHIE

1. Bailey, V. L. (1962) *Brittonia* **14**, 1.
2. Bailey, H. E. et Bailey, V. L. (1965) *Lloydia* **28**, 27.
3. Garestier, R. et Rideau M. (1972) *C.R. Acad. Sci., Ser. D*, **274**, 3541.
4. Garestier, R. et Rideau, M. (1972) *C.R. Acad. Sci., Ser. D*, **274**, 2651.
5. Chénieux, J. C., Maupas, P., Rideau, M., Verchère C. et Viel C. (1976) *C.R. Acad. Sci. Ser. D*, **283**, 101.
6. Reisch, J., Szendrei, K., Minker, E. et Novák, I. (1969) *Pharmazie* **24**, 699.
7. Grondon, M. F. et McColl, I. S. (1975) *Phytochemistry* **14**, 143.

8. Bowman, R. M., Collins, J. F. et Grundon, M. F. (1973) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 626.
9. Boyd, D. R. et Grundon, M. F. (1970) *J. Chem. Soc. (C)* 556.
10. Waterman, P. G. (1973) *Biochem. System.* **1**, 153.
11. Rapoport, H. et Holden, K. G. (1959) *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 3738.
12. Waterman, P. G. (1975) *Biochem. System. Ecol.* **3**, 149.
13. Mitscher, L. A., Bathala, M. S., Clark, G. W. et Beal, J. L. (1975) *Lloydia* **38**, 109.
14. Reisch, J., Szendrei, K., Pápay, V., Minker, E. et Novák, I. (1970) *Tetrahedron Lett.* 1945.
15. Reisch, J., Szendrei, K., Novák, I. et Minker, E. (1974) *Acta Pharm. Hung.* **44**, 107.
16. Corral, R. A. et Orazi, O. O. (1965) *Tetrahedron* **21**, 909.
17. Newhall, W. F. (1974) *J. Agric. Food Chem.* **22**, 465.
18. Jaffe, M. J. (1970) *Plant Physiol.* **46**, 768.
19. Viel, C. et Doré, J. C. (1972) *Farmaco, Ed. Sci.* **27**, 257.
20. Plakogiannis, F. M., Lien, E. J. et Biles, J. A. (1971) *J. Med. Chem.* **14**, 430.
21. Ambrose, E. J., James, A. M. et Lovich, J. H. B. (1956) *Nature* **177**, 576.
22. Lucas, E. H., Lickfeldt, A., Gottshall, R. Y. et Jennings, J. C. (1951) *Bull. Torrey Bot. Club* **78**, 310.
23. Szendrei, K., Minker, E., Koltai, M., Reisch, J., Novák, I. et Buzás, G. (1969) *Pharmazie* **23**, 519.
24. Gautheret, R. J. (1959) *La Culture des Tissus Végétaux. Techniques et Réalisations*. Masson et Cie, Paris.
25. Adamson, D., Hinde, R. et Kamisaka, S. (1972) in *Plant Growth Substances* (Carr, D. J., ed.) pp. 428-434. Springer, Berlin.
26. Pilet, P. E. et Dubouchet, J. (1962) *R3v. Gen. Bot.* **69**, 545.