

## DEUX NOUVELLES ACETOGENINES MONOTETRAHYDROFURANNIQUES CYTOTOXIQUES: L'ANNOMONICINE ET LA MONTANACINE

Akino JOSSANG<sup>1</sup>, Béatrice DUBAELE et André CAVÉ

Laboratoire de Pharmacognosie, associé au CNRS, Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris-Sud,  
Rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.

<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie, associé au CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, 63 rue Buffon,  
75231 Paris Cedex 05, France.

Marie-Hélène BARTOLI et Hélène BERIEL

Laboratoire de Physiologie-Pharmacologie I, UFR de Pharmacie de Grenoble, Domaine de la Merci,  
38706 La Tronche Cedex, France.

**Abstract:** The structures of annomonicin **1** and montanacin **2**, two novel monotetrahydrofuran fatty acid  $\gamma$ -lactones (acetogenins) isolated from *Annona montana* (Annonaceae), were determined by spectral analysis. Cytotoxic activities were measured against L1210, P388 and MDA-MB231 cell lines.

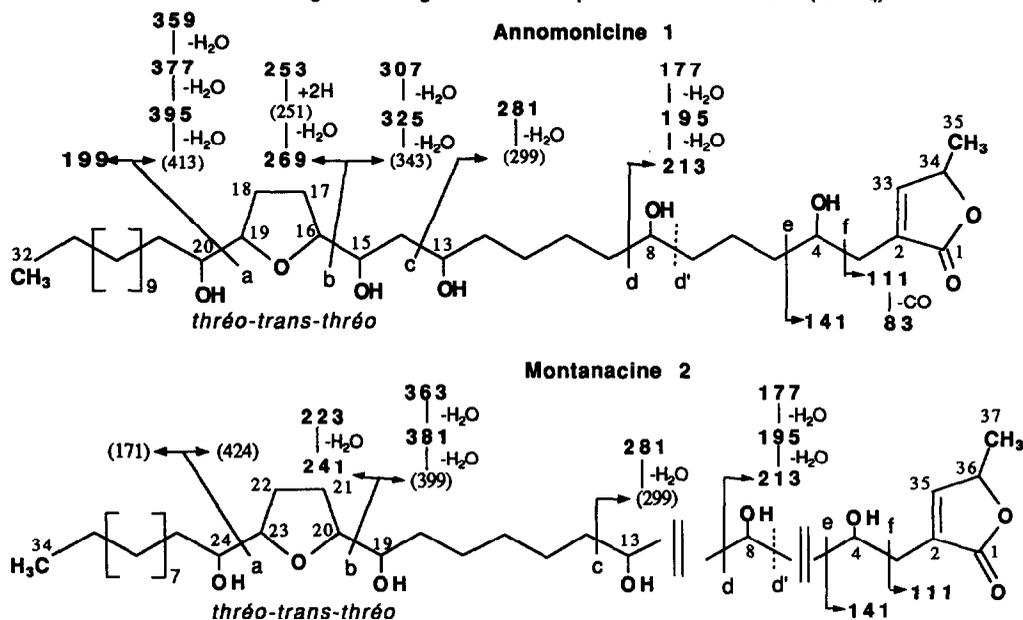
Des acétogénines bistétrahydrofuranniques biologiquement actives sont actuellement isolées en nombre croissant des Annonacées (1, 2). Par contre, en ce qui concerne les acétogénines monotétrahydrofuranniques, seules l'annonacine et la goniotalamicine sont décrites (3, 4).

Des graines de *Annona montana* Macf. (2,6 kg), récoltées en Guyane, deux nouvelles acétogénines  $\gamma$ -lactone-monotétrahydrofuranniques, que nous avons nommées annomonicine **1** et montanacine **2**, ont été isolées ainsi que l'annonacine et la goniotalamicine (0,01, 0,06, 0,44 et 0,04 %). Elles possèdent une activité cytotoxique sur les cellules des leucémies murines L1210 et P388 et d'un adénocarcinome mammaire humain MDA-MB231. **1** et **2** ont été isolées de l'extrait à l'éther de pétrole par chromatographies successives sur colonne et ccm préparative sur silice (élution par des mélanges  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH de polarité croissante).

L'annomonicine **1** est un solide blanc d'aspect cireux, F 45 - 48°C,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +4^\circ$  (c 1,0, MeOH). Les spectres de masse (ic- $\text{CH}_4$ ,  $[\text{MH}]^+$  613) (5) et de rmn du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 et 50 MHz respectivement, tab.1) ont permis d'établir la formule brute  $\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_8$ . Le sm, ic- $\text{CH}_4$ , montre la perte successive de 5 molécules d'eau ( $m/z$  595, 577, 559, 541, et 523) indiquant la présence de 5 OH; uv:  $\lambda_{\text{max}}$  MeOH 224 nm (log  $\epsilon$  4,50). La présence d'une  $\gamma$ -lactone  $\alpha,\beta$ -insaturée est suggérée par une réaction de Kedde positive et par des bandes à 1745 et 1640  $\text{cm}^{-1}$  dans le spectre ir.

Les spectres de rmn du  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  (300 MHz) 2D corrélés, et des découplages sélectifs indiquent l'enchaînement de la  $\gamma$ -lactone  $\alpha,\beta$ -insaturée avec un hydroxyle en 4 (fig.1). En effet le signal à 5,05 ppm (H-34) est corrélé avec ceux situés à 7,20 (H-33) et 1,39 ppm ( $\text{CH}_3$ -35). Le couple de 2 signaux à 2,38 (H-3a) et 2,45 ppm (H-3b) est corrélé avec ceux à 3,81 (H-4), 5,05 (H-34) et 7,20 ppm (H-33). Les pics correspondants en rmn du  $^{13}\text{C}$  sont 174,71 (C-1), 130,92 (C-2), 152,02 (C-33), 78,02 (C-34) et 19,03 ppm (C-35) pour la partie  $\gamma$ -lactonique et 33,24 (C-3), 69,67 ppm (C-4) pour le début de la chaîne.

Un autre enchaînement monotétrahydrofurannique est mis en évidence par les signaux suivants: 2H en 15 et 20 à 3,36 ppm corrélés avec  $2\text{CH}_2$  en 14 et 21 à 1,35 ppm d'une part, et avec 2H en 16 et 19 à 3,74 ppm

Figure 1. Fragmentation en spectrométrie de masse (ic-CH<sub>4</sub>).

d'autre part. Ces derniers sont corrélés avec 2 signaux à 1,60 ppm des 2H en 17 et 18 et à 1,85 ppm des autres 2H en 17 et 18. En rmn du <sup>13</sup>C les 2 carbones hydroxylés en 15 et 20 résonnent à 74,04 et 74,19 ppm et pour C-16 et C-19 du cycle THF à 82,56 et 82,77 ppm. La présence des chaînes aliphatiques est suggérée par un triplet d'un méthyle en 32 à 0,85 ppm et par des multiplets centrés à 1,22 et 1,35 ppm (CH<sub>2</sub> en α de OH).

Les deux autres hydroxyles sont isolés au milieu de la chaîne. En effet les protons à 3,82 ppm et à 3,81 ppm sont liés chacun à 2CH<sub>2</sub> à 1,35 ppm. Ils correspondent aux 2 carbones hydroxylés à 69,31 et 72,34 ppm sur le spectre de rmn du <sup>13</sup>C.

L'étude en rmn du <sup>1</sup>H du dérivé pentaacétylé confirme la présence d'un cycle THF: 5 protons géminés à une fonction acétoxyde sont déblindés à 4,85 ppm (H-8, -13, -15 et -20) et 5,10 ppm (H-4). Les 2H en 16 et 19 du cycle THF se détachent en se déplaçant légèrement à 3,95 ppm.

La position des hydroxyles et la longueur des chaînes ont été déterminées par l'étude du sm, ic-CH<sub>4</sub>, (5) dont le résultat est résumé figure 1. Les fragmentations aux niveaux a et b produisent des pics à *m/z* 199, 395 et 269, 325 respectivement. Par conséquent les deux chaînes aliphatiques en 19 et 16 du cycle tétrahydrofurannique sont constituées de 13 carbones avec un hydroxyle pour l'une et quatre hydroxyles et un cycle méthyl γ-lactonique pour l'autre.

Les coupures aux niveaux c et d donnent respectivement naissance à des pics à *m/z* 281, résultant d'une perte de molécule d'eau, et *m/z* 213 et indiquent les positions des hydroxyles en 13 et en 8. Le sm-ic-CH<sub>4</sub> de l'annomonicine pentaacétylée confirme la présence de 5 groupes acétoxylés et leurs positions en 4, 8, 13, 15 et 20 par les fragmentations aux niveaux a, b, c, d', e et f.

La montanacine 2, F 53-55°C, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 15° (c 1,0, MeOH), possède la formule brute C<sub>37</sub>H<sub>68</sub>O<sub>8</sub> déduite de son sm-ic-CH<sub>4</sub> ([MH]<sup>+</sup> 641) (6) et des spectres de rmn du <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C. La perte successive de 5

Tableau 1. Rmn  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des annomonicine **1**, montanacine **2** et dérivés pentaacétylés ( $\text{CDCl}_3$ ).

	1 $^1\text{H}$	1 $^{13}\text{C}$	1Ac $^1\text{H}$	2 $^1\text{H}$	2 $^{13}\text{C}$	2Ac $^1\text{H}$
1	-	174,71	-	-	174,72	-
2	-	130,92	-	-	130,96	-
3a	2,38 dm 14	33,24	2,48 m	2,42 md 14	33,29	2,47 m
3b	2,45 dm 14		2,52 m	2,53 md 14		2,52 m
4	3,81 m	69,67	5,10 m	3,81 m	69,77	5,07 m
5	1,45 m	37,42	1,55 m	1,48 m	37,15	1,53 m
6	1,22 m	22,84	1,21 m	1,25 m	22,66	1,23 m
7	1,35 m	31,66	1,55 m	1,35 m	31,88	1,53 m
8	3,81 m	72,34	4,85 m	3,81 m	71,37	4,83 m
9	1,35 m	31,66	1,55 m	1,35 m	31,88	1,53 m
10, 11	1,22 m	25,54	1,21 m	1,25 m	25,55	1,23 m
12	1,35 m	36,77	1,55 m	1,35 m	37,13	1,53 m
13	3,82 m	69,31	4,85 m	3,82 m	69,49	4,83 m
14	1,35 m	37,90	1,48 m	1,35 m	37,11	1,53 m
15	3,36 m	74,04	4,85 m	1,25 m	29,32	1,23 m
16	3,74 m	82,56	3,95 m	1,25 m	29,64	1,23 m
17	1,60m 1,85 m	28,06	1,60m 1,90m	1,25 m	29,32	1,23 m
18	1,60m 1,85 m	28,84	1,60m 1,90m	1,35 m	31,88	1,53 m
19	3,74 m	82,77	3,95 m	3,40 m	74,05	4,83 m
20	3,36 m	74,19	4,85 m	3,78 m	82,57	3,95 m
21	1,35 m	31,66	1,48 m	1,62m 1,96m	28,06	1,58m 1,95m
22	1,22 m	29,31	1,21 m	1,62m 1,96m	28,88	1,58m 1,95m
23	1,22 m	29,64	1,21 m	3,78 m	82,71	3,95 m
24	1,22 m	29,64	1,21 m	3,40 m	74,18	4,83 m
25	1,22 m	29,64	1,21 m	1,35 m	31,75	1,53 m
26-29	1,22 m	29,64	1,21 m	1,25 m	29,64	1,23 m
30	1,22 m	31,66	1,21 m	1,25 m	29,64	1,23 m
31	1,22 m	22,64	1,21 m	1,25 m	29,64	1,23 m
32	0,85 t 7	14,08	0,84 t 7	1,25 m	31,88	1,23 m
33	7,20 d 1	152,02	7,08 d 1	1,25 m	22,66	1,23 m
34	5,05 dq 1;7	78,02	5,00 dq 1;7	0,87 t 7	14,10	0,87 t 7
35	1,39 d 7	19,03	1,40 d 7	7,20 d 1	152,05	7,05 d 1
36	-	-	-	5,05 dq 1;7	78,05	5,02 dq 1; 7
37	-	-	-	1,42 d 7	19,04	1,42 d 7
Ac			2,01 2,04 2,08(2) 2,09			2,00 2,01 2,05(2) 2,07

molécules d'eau produit des ions à  $m/z$  623, 605, 587, 569 et 551 indiquant la présence de 5 hydroxyles. **2** donne une réaction de Kedde positive et les spectres: rmn  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , ir, uv, sont analogues à ceux de **1**.

La molécule **2** possède  $2\text{CH}_2$  de plus que **1**. Les fragmentations en sm-ic- $\text{CH}_4$  sont présentées figure 1. La coupure au niveau a est seulement observée avec le dérivé acétylé. La fragmentation b donnant les ions  $m/z$  241 et 381 indique que l'une des chaînes aliphatiques est constituée de 11 atomes de carbone et 1 hydroxyle et l'autre de 17 carbones, 4 hydroxyles et une  $\gamma$ -lactone  $\alpha,\beta$ -insaturée et méthylée. Les fragments

Tableau 2.

	cis		érythro			trans		thréo		
Acétogénine $^{13}\text{C}$ , ppm	81	83	72	3,80	$\Delta\delta_{2,5}=\text{ca. } 2$	82	83	74	$\Delta\delta_{2,5} < 1,5$	
Acétogénine $^1\text{H}$ , ppm	3,80	3,80	3,80			3,80	3,80	3,40		
Acétate $^1\text{H}$ , ppm	3,85	3,98	4,91			3,90	3,98	4,85		

produits par scission en c,d et e sont identiques à ceux de 1. Les cinq hydroxyles de 2 ont pu être ainsi situés en 4, 8, 13, 19 et 24.

L'analyse des données décrites (2,7,8 et 9) nous a permis d'observer une relation entre la configuration relative et les spectres de rmn du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  de la partie bistétrahydrofurannique des acétogénines (tab. 2). Les déplacements chimiques moyens de C-2 et C-5 du motif THF sont 83 et 81 ppm ( $\Delta\delta = \text{ca. } 2 \text{ ppm}$ ) pour l'isomère *cis* et 83 et 82 ppm ( $\Delta\delta < 1,5 \text{ ppm}$ ) pour l'isomère *trans*. Pour les stéréochimies *erythro* et *thréo* en position 2 et  $\alpha$ , les signaux des méthines en  $\alpha$  en rmn du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont à 3,80 et 72 ppm et à 3,40 et 74 ppm respectivement.

Les valeurs de l'annonacine 1 correspondant à ces quatre positions: 74,04 (3,36), 82,56, 82,77 et 74,19 (3,36) ppm, nous conduisent à proposer les stéréochimies relatives 15-16-19-20 *thréo-trans-thréo*. La montanacine 2 posséderait les mêmes configurations relatives 19-20-23-24 *thréo-trans-thréo*. La configuration des quatre autres centres chiraux n'a pas été déterminée.

L'activité cytotoxique des quatre acétogénines isolées a été comparée à celle de l'adriamycine (tab. 3). On observe que l'annonacine 4 possède une activité inhibitrice *in vitro* nettement supérieure à celle de l'adriamycine sur les cellules leucémiques murines L1210 et P388. La cytotoxicité de 1 et 2 ( $\text{CI}_{50}$  supérieures donc moindre toxicité) est comparable à celle de la goniothalamine 3 et de l'adriamycine. Les acétogénines 1, 2 ainsi que 3 sont légèrement moins inhibitrices de la croissance des cellules de l'adénocarcinome mammaire humain MDA-MB231 que 4 et l'adriamycine. L'activité *in vivo* de 3 et 4 a été précédemment décrite (4).

Tableau 3.		L1210	P388	MDA-MB231
Activité antitumorale <i>in vitro</i> des acétogénines isolées.	Adriamycine	$1,31 \cdot 10^{-1}$	$5,21 \cdot 10^{-2}$	$7,38 \cdot 10^{-2}$
	Annonacine 1	$1,46 \cdot 10^{-2}$	$2,44 \cdot 10^{-1}$	1,16
	Montanacine 2	$1,21 \cdot 10^{-2}$	$1,52 \cdot 10^{-1}$	$3,55 \cdot 10^{-1}$
$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ): concentration inhibant de 50 % la croissance cellulaire.	Goniothalamine 3	$2,49 \cdot 10^{-2}$	$1,35 \cdot 10^{-1}$	$7,84 \cdot 10^{-1}$
	Annonacine 4	$1,76 \cdot 10^{-6}$	$8,88 \cdot 10^{-4}$	$8,35 \cdot 10^{-2}$

**Remerciements:** Nous remercions Mme J. Mahuteau et Mme M.T.Martin pour l'enregistrement des spectres de rmn.

#### Références et notes.

- S.D. Jolad, J.J. Hoffmann, K.H. Schram, J.R. Cole, M.S. Tempesta, G.R. Kreik et R.B. Bates, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 3151.
- Y.H. Hui, J.K. Rupprecht, J.E. Anderson, Y.M. Liu, D.L. Smith, C.J. Chang et J.L. McLaughlin, *Tetrahedron*, 1989, **45**, 6941.
- T.G. McCloud, D.L. Smith, C.J. Chang et J.M. Cassady, *Experientia*, 1987, **43**, 947.
- A. Alkofahi, J.K. Rupprecht, D.L. Smith, C.J. Chang et J.L. McLaughlin, *Experientia*, 1988, **44**, 83.
- Sm-ic- $\text{CH}_4$  de 1:  $m/z$  613 ([MH] $^+$ , 54%), 595(28), 577(24), 559(39), 541(29), 523(9), 395(9), 377(8), 359(8), 325(60), 307(37), 281(37), 269(15), 253(29), 213(29), 199(18), 195(32), 177(10), 141(15), 125(20), 111(57), 97(54), 83(100). Pentaacétyl 1:  $m/z$  823([MH] $^+$ , 0%), 763(19), 703(24), 643(25), 583(16), 523(9), fragmentation en a: 581(18), 241(18), 181(45), en b: 311(56), 251(43), en c: 425(11), 305(15), en d': 225(19), 165(21), en e: 183(17), 123(22), en f: 111(100).
- Sm-ic- $\text{CH}_4$  de 2:  $m/z$  641 ([MH] $^+$ , 9%), 623(4), 605(2), 587(7), 569(5), 551(1), 381(19), 363(8), 281(13), 241(7), 223(6), 213(15), 195(100), 177(21), 141(6), 111(11). Pentaacétyl 2:  $m/z$  851 ([MH] $^+$ , 0%), 791(0), 731(13), 671(17), 611(10), 551(25), fragmentation en a: 213(17), 153(37), en b: 283(6), 285(8), 223(9), en b': 495(28), 496(14), 435(13), en c: 425(7), d': 225(12), 165(55), en e: 183(31), 123(56), f: 111(100).
- T.R. Hoye et J.C. Suhadolnik, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 4402.
- T.R. Hoye et Z.P. Zhuang, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 5578.
- G.R. Pettit, G.M. Cragg, J. Polonsky, D.L. Herald, A. Goswami, C.R. Smith, C. Moretti, J.M. Schmidt et D. Weisleder, *Can. J. Chem.*, 1987, **65**, 1433.