

IV. METABOLITES SECONDAIRES ISSUS de *Turraea* sp.

IV.1. Cadrage

Le genre *Turraea* appartient à la famille Meliaceae et compte environ 85 espèces dans le monde.⁷¹ Les 24 espèces de *Turraea* rencontrées à Madagascar sont toutes endémiques. Certaines plantes du genre *Turraea* sont très utilisées en médecine traditionnelle à Madagascar. La plus connue est *T. sericea* ou « Fanazava » qui entre dans la composition des « sotromangidy » ou infusions amères jouissant d'une grande réputation pour ses effets stimulant et aphrodisiaque.⁷² Les fruits mûrs et les écorces amères de certaines espèces de *Turraea* sont employés en médecine traditionnelle malgache pour traiter les maux de gorge et la conjonctivite, et pour améliorer l'acuité visuelle.^{73,74}

De nombreuses études chimiques et biologiques ont été consacrées au genre *Turraea* du fait de sa richesse en limonoïdes, triterpénoïdes et prégnanes. Ces produits possèdent des activités cytotoxique, larvicide et anti-appétante pour les insectes.^{75,76}

Différentes parties d'une espèce non identifiée spécifiquement au niveau taxonomique *Turraea* sp. ont été récoltées près du village d'Antenina à l'Ouest du Parc National de Zahamena en 2002. Lors d'un criblage antiplasmodial effectué au CNARP, l'extrait éthanolique des feuilles s'est montré actif sur la souche chloroquino-résistante FCM29 de *Plasmodium falciparum* avec une valeur de CI_{50} égale à 3,9 µg/mL. De ce fait, son fractionnement bio-guidé a été entrepris afin d'isoler le (ou les) principe(s) actif(s) correspondant(s).

⁷¹ Mabberly, D. J. (1997) - The Plant Book, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, p 733.

⁷² Boiteau, P., Boiteau, M., Allorge-Boiteau, L. (1999) – Dictionnaire des noms malgaches de végétaux. Editions Alzieu, Grenoble, France, pp. 298.

⁷³ Boiteau, P. (1986). Médecine traditionnelle et pharmacopée : précis de matière médicale malgache, Agence de Coopération Culturelle et technique, p. 45

⁷⁴ Boiteau, P. (1975). Dictionnaire des noms malgaches des végétaux, Fitoterapia, 5, XLVI : 220.

⁷⁵ Sarker, S.D., Savchenko, T., Whiting, P., Sik, V., Dinan, L. (1997) - Two limonoids from *Turraea obtusifolia* (Meliaceae), prierianin and rohitukin, antagonise 20-hydroxyecdysone action in a *Drosophila* cell line. Arch Insect Biochem Physiol., 35: 211-217.

⁷⁶ Wang, X.-N., Fan, C.-Q., Yin, S., Lin, L.-P., Ding, J., Yue, J.-M. (2008) – Cytotoxic terpenoids from *Turraea pubescens*. Helv. Chim. Acta, 91: 510–519.



Figure 7 : Photographie de *Turraea* sp.
Source : Patrice Antilahimena (Missouri Botanical Garden)

IV.2. Résultats et discussion

IV.2.1. Isolement et identification structurale

La première étape du fractionnement de l'extrait éthanolique (3,5 g) consistait en un partage liquide-liquide avec des solvants non miscibles entre eux pour donner quatre fractions : hexanique (0,85 g), chloroformique (1,88 g), butanolique (0,13 g) et aqueux (0,31 g). Les fractions hexanique et chloroformique ont montré les meilleures activités antiplasmodiales avec des valeurs de CI_{50} égales à 1 et 1,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. La fraction chloroformique dont le rendement est plus élevé (8,24 %) que la fraction hexanique (3,73 %) a été retenue pour la suite des travaux chimiques d'isolement.

Les fractions **A1-A9** résultant de la chromatographie sur colonne de silice de la fraction chloroformique étaient moins actives que cette dernière en présentant des valeurs de CI_{50} supérieures à 3 $\mu\text{g/mL}$ (Schéma 5). Cette forte diminution de l'activité antiplasmodiale pourrait provenir, soit de la séparation des constituants actifs à l'issue du fractionnement, soit de la dégradation de certaines molécules actives au cours du fractionnement. Malgré de tels désagréments, la purification des fractions ayant montré une activité antiplasmodiale avec des valeurs de CI_{50} inférieures à 20 $\mu\text{g/mL}$ a été poursuivie. Quatre produits **5.1 - 5.4** ont été ainsi isolés.

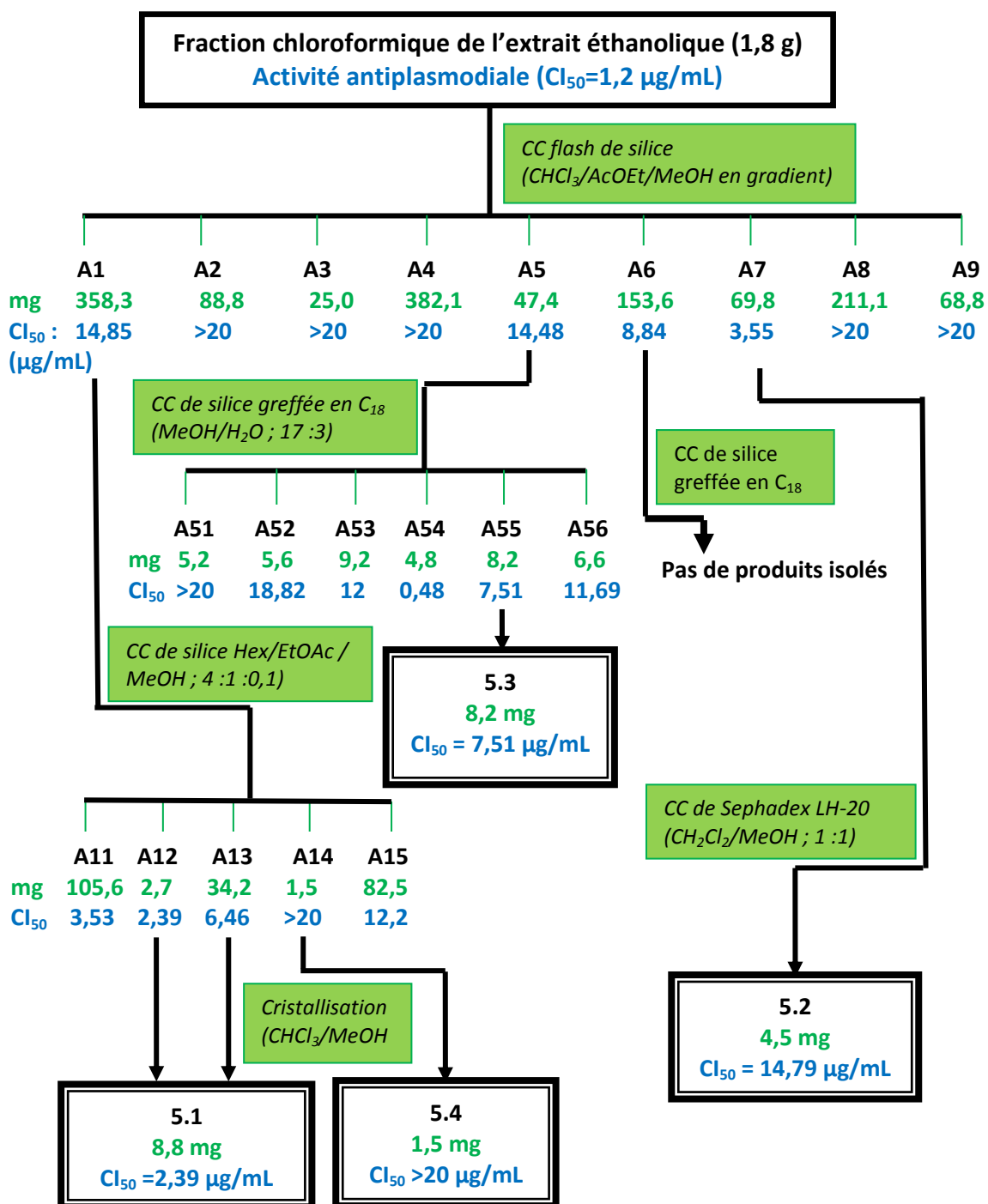
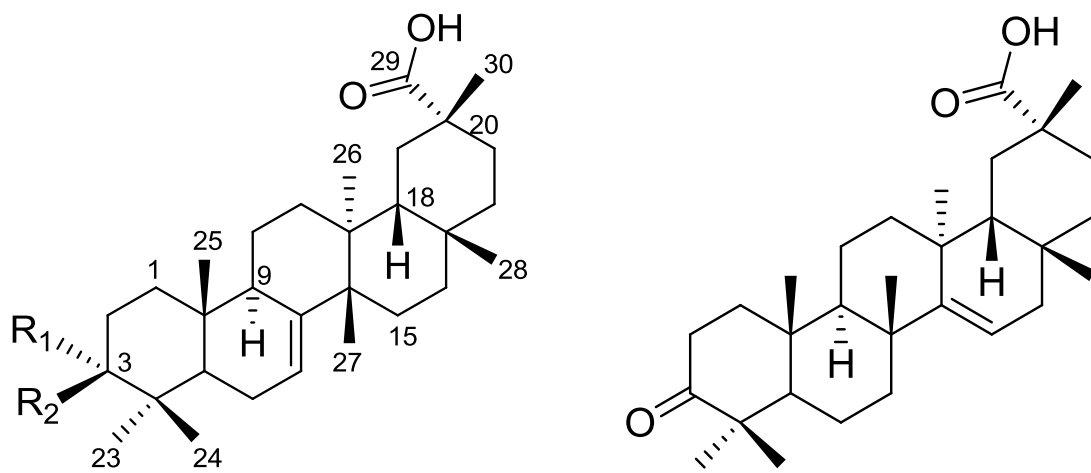


Schéma 5 : Protocole d'isolement des produits 5.1 - 5.4 issus de *Turraea* sp.

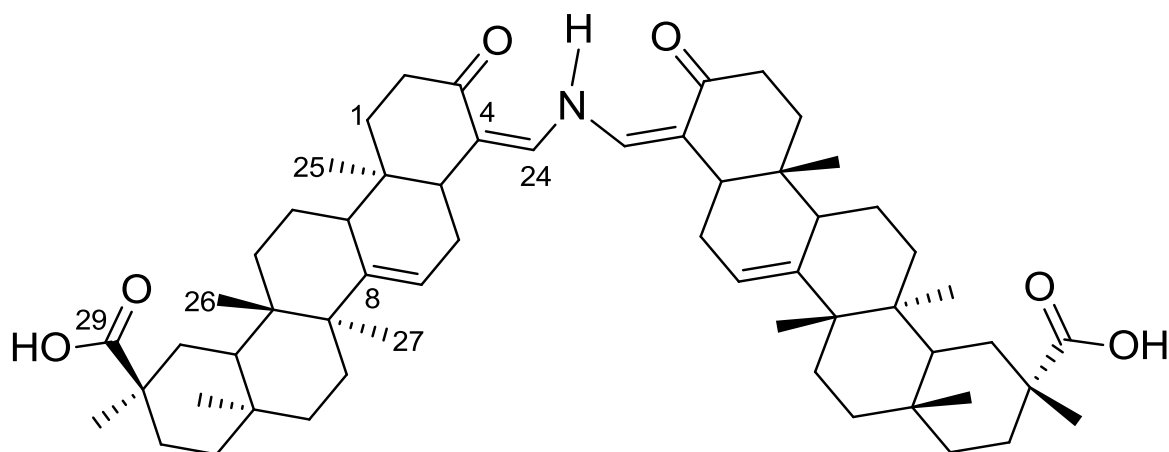
Les structures chimiques des produits **5.1** – **5.4** sont représentées à la figure 8. Les produits **5.3** et **5.4** sont des triterpènes pentacycliques connus et identifiés respectivement à l'acide triptocallique B ou acide 3-hydroxymultiflor-7-én-29-oïque (type multiflorane) et l'acide ensculentoïque ou acide 3-oxo-taraxér-14-én-29-oïque (type taraxérane).



5.1: $R_1=R_2=O$

5.3: $R_1=H$, $R_2=OH$

5.4



5.2

Figure 8 : Structures chimiques des produits 5.1-5.4 issus de *Turraea* sp.

Les démarches suivies qui ont permis d'attribuer les structures chimiques **5.1** et **5.2** aux deux autres produits isolés sont résumées ci-après. Pour la clarté de l'exposé, nous supposons ces structures établies.

Identification structurale du produit 5.1

Le spectre de masse ESI à haute résolution du produit **5.1** fournit un pic pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 455,3517, compatible avec la composition élémentaire $C_{30}H_{47}O_3$ (calculé : 455,3525).

Sur son spectre RMN ^1H , sont observés des signaux attribuables à sept groupements méthyles tertiaires à δ 0,93 (s, 3H, H-27), 0,98 (s, 6H, H-23 et H-25), 1,03 (s, 3H, H-26), 1,01 (s, 3H, H-28), 1,10 (s, 3H, H-24) et 1,23 (s, 3H, H-30), et un proton oléfinique à δ 5,47 (dd, $J=6,4$ et $3,2$ Hz, H-7). La présence de signaux à δ 2,25 (dt, $J=14,5$ et $3,7$ Hz, H-2a) et 2,73 (dt, $J=14,5$ et $5,5$ Hz, H-2b) imputables à des protons d'un groupement méthylénique en α d'un carbonyle est également notée.

L'interprétation des spectres RMN ^{13}C et ^{13}C DEPT-135 révèle l'existence de 30 pics de résonance engendrés par une fonction cétone à δ 217,2 (C-3), une fonction acide carboxylique à δ 184,5 (C-29), une double liaison trisubstituée à δ 117,3 (C-7) et 145,6 (C-8), dix méthylènes, trois méthines, six carbones d'hybridation sp^3 et sept méthyles.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du produit **5.1** présentent de grandes analogies avec ceux de l'acide triptocallique B (**5.3**). En effet, l'étude comparative de leurs spectres RMN ^1H et ^{13}C montre que les déplacements chimiques des signaux dus aux groupements méthyles, méthylènes et méthines sont identiques pour les deux produits, sauf ceux provenant du cycle A.

La présence du groupement carbonyle en C-3 et d'un groupement méthyle en C-10 ainsi que la position du méthine oléfinique en C-7 sont déduites des taches de corrélation observées sur le spectre HMBC entre H-1 et C-3, H-23 et H-24 et C-3, C-4 et C-5, H-25 et C-1, C-9 et C-5, H-7 et C-5, C-9 et C-14. Les corrélations HMBC entre H-26 et C-12, C-14 et C-18 d'une part, et entre H-30 et C-29, C-19 et C-21 d'autre part, suggèrent que la fonction acide carboxylique se trouve en position C-29 et que les carbones C-13 et C-20 sont méthylés. De la même manière, des corrélations HMBC indiquent que les carbones C-14 et C-17 sont substitués chacun par un groupement méthyle. Le mode de substitution du squelette pentacyclique par les sept groupements méthyles et la fonction carboxyle correspond à celui d'un triterpène pentacyclique de la série multiflorane.⁷⁷

⁷⁷ Mahato, S.B., Kundu, A.P. (1994) – ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37: 1517-1575.

Les données spectrales en RMN 1D et 2D ci-dessus combinées avec la composition élémentaire permettent de proposer la structure chimique suivante pour le produit **5.1** : acide 3-oxo-multiflor-7-én-29-oïque, dénommé acide turranoïque. La fonction alcool en position 3 dans l'acide triptocallique B (**5.3**) est remplacée par un groupe carbonyle dans l'acide turranoïque (**5.1**), conférant à ce dernier son originalité.

Identification structurale du produit 5.2

Le produit **5.2** possède la formule moléculaire $C_{58}H_{83}NO_6$ déterminée par spectrométrie de masse ESI à haute résolution ($[M+H]^+$ à m/z 890,6311; calculé : 890,6299).

Son spectre RMN 1H comporte un doublet assigné à deux protons méthiniques oléfiniques à δ 6,46 ($J=11,4$ Hz, H-24 et H-24') et un singulet élargi attribuable à deux protons méthiniques oléfiniques à δ 5,40 (H-7 et H-7'). Il fait également apparaître un triplet à δ 14,0 ($J=11,4$ Hz) dû à la résonance du proton fortement chélaté du groupement amine secondaire.

Une expérience TOCSY 1D réalisée en excitant sélectivement le proton de l'amine secondaire (triplet centré à δ 14,0) a permis de discerner une séquence de protons couplés qui est formée par le proton de l'amine secondaire et les deux protons oléfiniques résonant à δ 6,46 (doublet, H-24 et H-24'); ce qui établit sans ambiguïté la structure partielle $=CH-NH-CH=$.

Sur ses spectres RMN ^{13}C et ^{13}C DEPT-135, des signaux correspondant à des fonctions cétone (δ 200) et carboxyle (δ 189,9), et des pics de résonance de carbones oléfiniques (δ 115,8, CH ; δ 146,5, C ; δ 114,0, C ; δ 141,5, CH) ont été repérés.

Les spectres RMN 1H et ^{13}C du produit **5.2** montrent des signaux superposables à ceux observés sur les spectres RMN 1H et ^{13}C de l'acide turranoïque (**5.1**). Cependant, sur le spectre RMN du 1H du produit **5.2**, on remarque la disparition des signaux à δ 0,98 (CH_3 -23) et 1,10 (CH_3 -24) assignés à deux groupements méthyles de l'acide turranoïque (**5.1**) et l'apparition d'un doublet à δ 6.46 ($J=11,4$ Hz) dû aux deux protons oléfiniques de la

séquence $=\text{CH}-\text{NH}-\text{CH}=\text{}$. Ces données suggèrent que les méthyles CH_3 -23 et CH_3 -24 sont remplacés par un méthine oléfinique, lui-même lié à un hétéroatome qui pourrait être le site de dimérisation de deux triterpènes de type multiflorène. Les deux carbones de la séquence $=\text{CH}-\text{NH}-\text{CH}=\text{}$ résonnent à δ 141,5 en montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec les deux protons oléfiniques à δ 6,46.

Afin d'assigner toutes les fonctions chimiques présentes dans **5.2** et de confirmer le site de dimérisation, une expérience HMBC a été réalisée. Les taches de corrélation entre les protons oléfiniques H-24 et H-24' (δ 6.46) et les carbones « qui les portent » (δ 141,5), confirment le fait que C-24 et C-24' sont reliés par le groupement amine secondaire et appartiennent respectivement à deux unités structurales du produit **5.2**. En outre, la présence d'une cétone en C-3 (C-3') est justifiée par les taches de corrélation observées sur le spectre HMBC entre H-24 (H-24') et C-3 (C-3') du carbonyle d'une cétone (δ 200) et C-5 (C-5') (δ 42,4). Des corrélations HMBC ont permis également de déterminer les positions de la double liaison entre C-7 et C-8 (C-7' et C-8') et du groupement carboxyle en C-20 (C-20').

La formule moléculaire de **5.2** requiert 18 degrés d'insaturation, dont 9 peuvent être attribués à l'acide 23-*nor*-3-oxo-multiflora-4(24),7-diène-29-oïque. En conséquence, les 9 restants proviennent de la deuxième moitié de la molécule qui est constituée par le même monomère.

L'ensemble de ces résultats permet d'avancer que le produit **5.2** est un dimère qui possède la structure chimique telle qu'elle est représentée à la figure 8. A notre connaissance, ce produit dénommé turraenine représente le premier exemple naturel de triterpénoïdes sous forme dimérique dans laquelle les deux monomères sont reliés par un pont azoté.

Les structures chimiques avancées pour les produits nouveaux **5.1** et **5.2** ont été confirmées par des analyses cristallographiques aux rayons X (Figures 9 et 10).

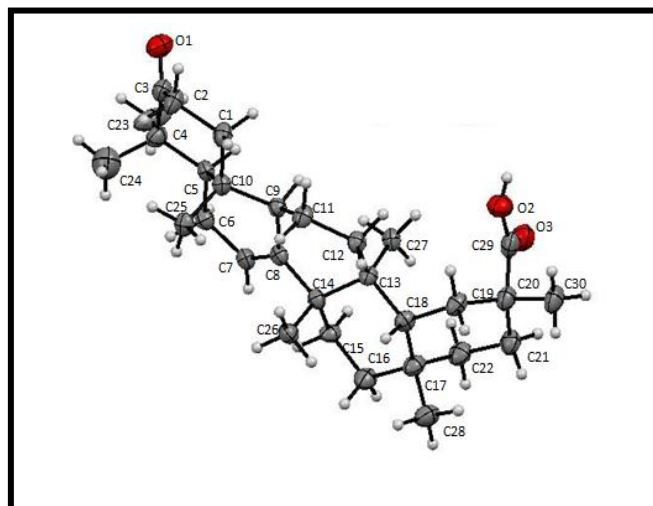


Figure 9 : Structure cristalline par rayons X de l'acide turranoïque

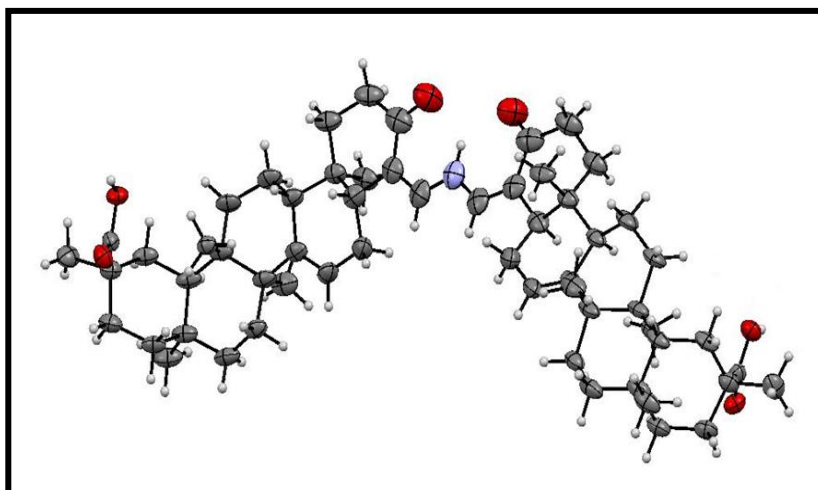


Figure 10 : Structure cristalline par rayons X de la turraenine

IV.2.2. Activités antiplasmodiale et cytotoxique des produits 5.1 – 5.4

L'acide turranoïque (**5.1**), la turraenine (**5.2**) et l'acide triptocallique B (**5.3**) ont montré une activité antiplasmodiale sur la souche chloroquino-résistante FCM29 de *Plasmodium falciparum* avec des valeurs de CI_{50} égales à 5,2, 16,6 et 16,4 μM , respectivement. L'acide ensculentoïque (**5.4**) était inactif dans ce test. Parmi les nombreux acides triterpéniques pentacycliques décrits dans la littérature figurent les acides ursolique (type ursane), oléanolique (type oléanane) et bétulinique (type lupane) qui sont très

répandus dans le règne végétal. Ces composés possèdent une activité antiplasmodiale *in vitro* et *in vivo*.^{78,79}

Quant à la cytotoxicité des quatre produits, l'acide turranoïque (**5.1**) est faiblement actif sur les lignées de cellules cancéreuses A2780 de l'ovaire ($CI_{50} = 20 \mu M$) et HT522-T1 du poumon ($CI_{50} = 16,4 \mu M$). Les produits **5.2-5.4** étaient inactifs dans ces deux tests. Des triterpénoïdes de type multiflorane sont décrits dans *Sandoricum indicum* (Meliaceae). Ils inhibent la prolifération des lymphocytes et sont cytotoxiques envers les lignées leucémiques HL-60 et P-388.⁸⁰

Les triterpénoïdes sont des métabolites secondaires que l'on rencontre très fréquemment chez les flores terrestre et marine, ainsi que la faune. Ils forment une des plus larges familles chimiques avec environ 300 nouvelles molécules décrites chaque année.⁸¹ En particulier, le genre *Turraea* est une riche source de triterpénoïdes. La mise en évidence de d'une nouvelle classe de triterpénoïde dimère avec un pont azoté dans *Turraea sp.* pourrait avoir un rôle important pour différencier cette espèce non suffisamment identifiée au niveau taxonomique des autres espèces appartenant au même genre. Des études supplémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Ces travaux s'inscrivent dans le programme d'activités du projet ICBG relatif à la bioprospection. Les résultats chimiques et biologiques sont publiés dans la revue « Organic Letters ».⁸²

⁷⁸ Bero, J., Hérent, M-F., Schmeda-Hirschmann, G., Frédérick, M., Quetin-Leclercq, J. (2013) - *In vivo* antimalarial activity of *Keetia leucantha* twigs extracts and *in vitro* antiplasmodial effect of their constituents. J Ethnopharmacol., 149: 176-183.

⁷⁹ De Sá, M.S., Costa, J.F.O., Krettli, A.U. et al. (2009) - Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* in *P. berghei*-infected mice. Parasitol. Res., 105: 275-279.

⁸⁰ Tanaka, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Fujimoto, H., Okuyama, E., Hayashi, M., Komiyama, K., Ishibashi, M. (2001) - New multiflorane-type triterpenoid acids from *Sandoricum indicum*. J. Nat. Prod., 64: 1243-1245.

⁸¹ Kuo, R-Y., Qian, K., Morris-Natschke, S.L., Kuo-Hsiung Lee, K-H. (2009) - Plant-derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents. Nat. Prod. Rep., 26: 1321-1344.

⁸² Rasamison, V.E., Rakotondraibe, L.H., Sleboznick, C., Brodie, P.J., Ratsimbason, M., TenDyke, K., Shen, Y., Randrianjanaka, L.M., Kingston, D.G.I. (2014) - Nitrogen - Containing Dimeric *nor*-Multiflorane Triterpene from a *Turraea sp.* Org. Lett., 16: 2626-2629.

V. METABOLITES SECONDAIRES ISSUS de *Vitex cauliflora* Moldenke

V.1. Cadrage

Le genre *Vitex* (Verbenaceae) est constitué par des arbustes hermaphrodites et comprend environ 250 espèces réparties dans les régions tropicales et tempérées. 42 espèces appartenant au genre *Vitex* sont rencontrées à Madagascar.⁸³ La revue de la littérature révèle que les espèces de ce genre produisent des lignanes, iridoïdes, flavonoïdes, stéroïdes et diterpénoïdes, dont certains possèdent des activités antibactérienne, antioxydante, cytotoxique et inhibitrice de la tyrosinase.^{84,85,86}

Vitex cauliflora Moldenke est une plante endémique de Madagascar qui pousse dans les forêts humides à une altitude entre 0 et 1600 m. Cette plante connue sous le nom vernaculaire « Lekary » a la réputation d'être toxique.⁸⁷ Son utilisation en médecine traditionnelle n'est pas documentée.

Lors du criblage antiplasmodial des extraits de diverses parties de plantes récoltées aux environs du Parc National de Zahamena dans la région Atsinanana en 2000, l'extrait éthanolique des parties aériennes de *V. cauliflora* était actif sur la souche chloroquinorésistante FCM29 de *Plasmodium falciparum* avec une valeur de CI_{50} égale à 30,7 µg/mL. Les constituants chimiques de la plante ont été examinés en considération de ce résultat du test biologique. De plus, à notre connaissance, *V. cauliflora* n'a pas encore fait l'objet d'investigations chimique et biologique.

⁸³ Schatz, G.E. (2001) - Generic tree flora of Madagascar. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 225.

⁸⁴ Kawazoe, K., Yutani, A., Tamemoto, K., Yusa, S., Shibata, H., Higuti, T., Takaisahi, Y. (2001) - Phenylnaphtalene compounds from the subterranean part of *Vitex rotundifolia* and their antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Nat. Prod., 64:588-591.

⁸⁵ Sridhar, C., Subbaraju, G.V., Gottumukkala, V., Venkateswarlu, Y., Venugopal, R.T. (2004) - New acylated iridoid glucosides from *Vitex altissima*. J. Nat. Prod., 67:2012-2016.

⁸⁶ Hu, P., Li, D-H., Hu, X., Li, S-G., Sai, C-M., Sun, X-C., Su, T., Bai, J., Wang, Z-H., Li, Z-L., Hua, H-M. (2016) – Lignans and triterpenoids from *Vitex negundo* var. *heterophylla* and their biological evaluation. Fitoterapia, 111:147-153.

⁸⁷ Boiteau, P., Boiteau, M., Allorge-Boiteau, L. (1999) – Dictionnaire des noms malgaches de végétaux. Editions Alzieu, Grenoble, France, p. 312.



Figure 11 : Photographie de *Vitex cauliflora* Moldenke
Source: Stephan Rakotonandrasana (CNARP)

V.2. Résultats et discussion

V.2.1. Isolement et identification structurale

Le partage liquide-liquide de l'extrait éthanolique bioactif (74 g, $Cl_{50} = 30,7 \mu\text{g/mL}$) a permis d'obtenir quatre fractions : hexanique (20,2 g, $Cl_{50} = 25,81 \mu\text{g/mL}$), chloroformique (15 g, $Cl_{50} = 5,14 \mu\text{g/mL}$), butanolique (3,4 g, $Cl_{50} = 22,36 \mu\text{g/mL}$) et aqueuse (30,4 g, non testée). Le schéma 6 résume les différentes étapes de fractionnement et purification ayant conduit à l'isolement de deux produits **6.1** et **6.2** à partir de la fraction chloroformique la plus active. Le protocole suivi a mis en œuvre des chromatographies successives sur colonne de silice, silice greffée en C_{18} et sur couche mince à l'échelle préparative. La purification finale du produit **6.1** a été effectuée par chromatographie liquide haute pression à l'échelle préparative.

Les structures chimiques des produits **6.1** et **6.2** sont représentées à la figure 12. Le produit **6.2** est un triterpène pentacyclique connu et identifié comme l'uvaol par l'interprétation de ses spectres de RMN ^1H et ^{13}C et par comparaison des données spectrales obtenues avec celles publiées dans la littérature.

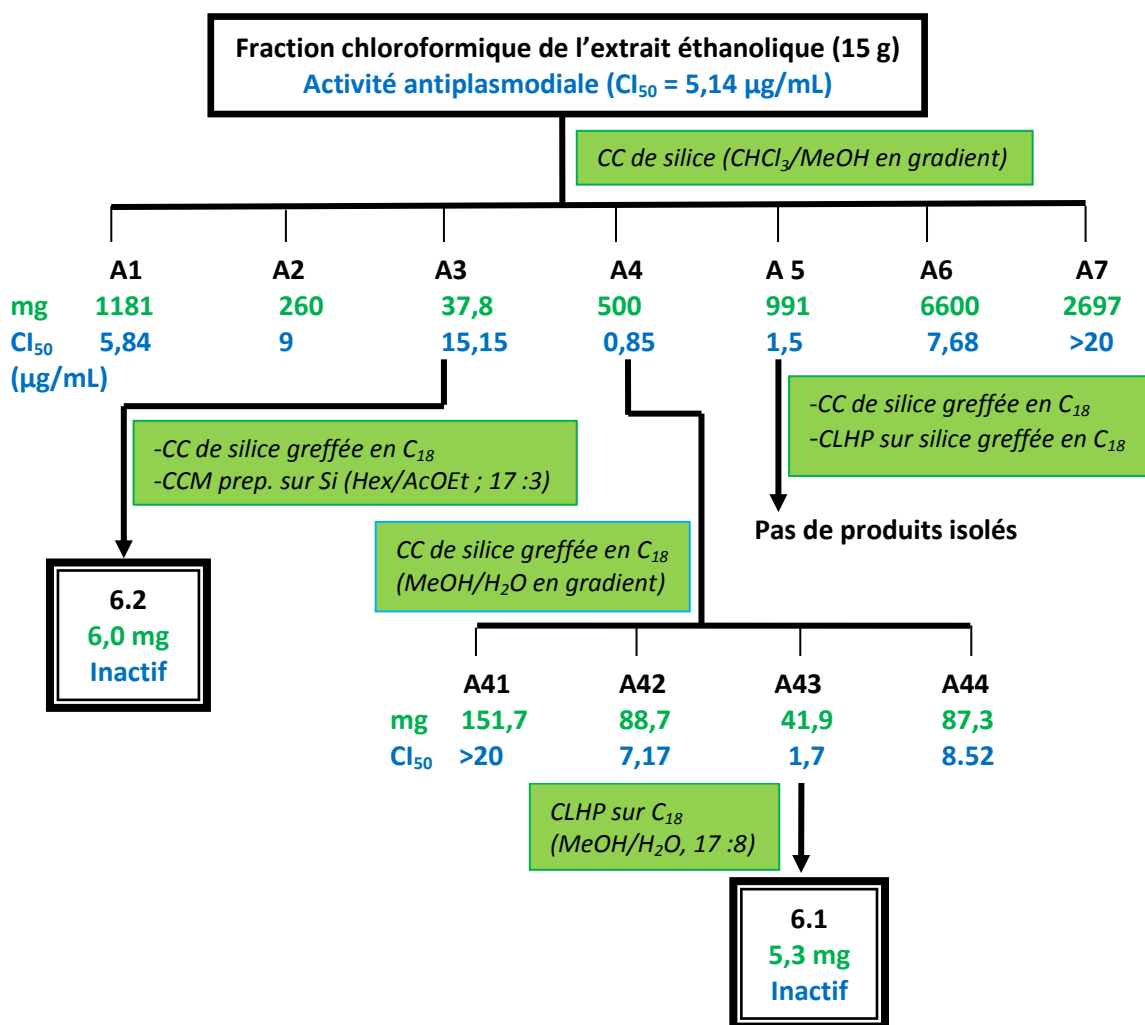


Schéma 6 : Protocole d'isolement des produits 6.1 et 6.2 issus de *V. cauliflora*.

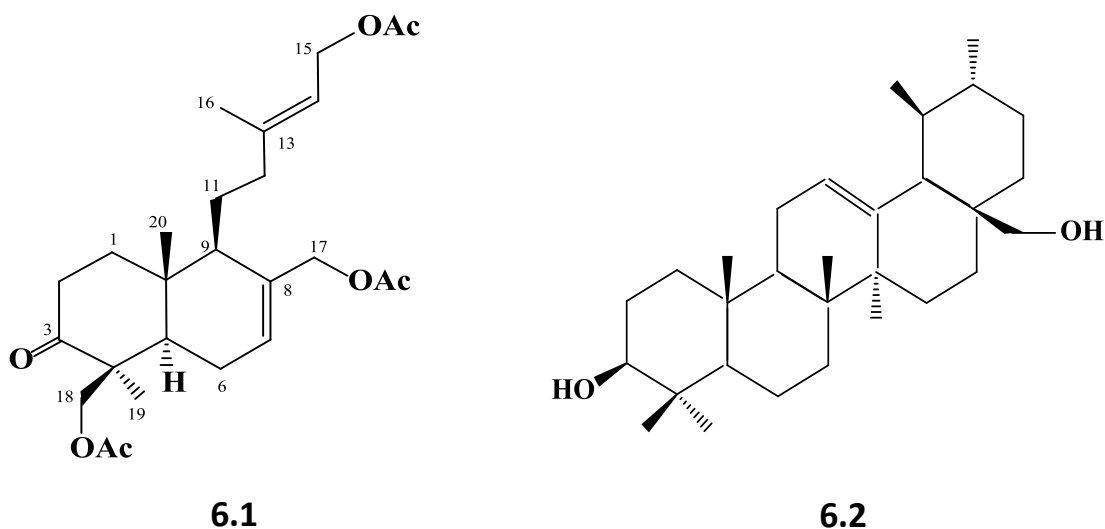


Figure 12 : Structures chimiques des produits 6.1 et 6.2 issus de *V. cauliflora*