

Identification structurale du produit 6.1

Le produit **6.1** a pour formule brute $C_{26}H_{38}O_7$ déterminée par spectrométrie de masse FAB à haute résolution.

Son spectre RMN 1H présente un triplet à δ 5,3 ($J=6,4$ Hz, H-14) et un singulet élargi à δ 5,8 (H-7) attribués chacun à un proton oléfinique. Trois singulets de trois protons chacun apparaissent à δ 1,97, 2,02 et 2,04 et sont assignés à trois groupements acétoxy. Les trois singulets de trois protons chacun à δ 1,01 (CH_3 -20), 1,11 (CH_3 -19) et 1,67 (CH_3 -16) sont dus à trois groupements méthyles tertiaires, respectivement. Un ensemble complexe de signaux situés entre δ 3,90 et 4,60 (H-15, H-17 et H-18b) et un doublet à δ 3,98 ($J=11.2$ Hz, H-18a) sont également observés sur le même spectre.

Les pics à δ 170,7, 170,8, 171,1, 20,8, 21,0 et 21,1 observés sur le spectre RMN ^{13}C confirment la présence de trois groupements acétoxy dans la structure chimique du produit **6.1**. Le même spectre montre l'existence d'une fonction cétone à δ 212,8 (C-3) et de deux systèmes oléfiniques trisubstitués à δ 128,1 (C-7) et 134,4 (C-8), et δ 141,7 (C-13) et 119,2 (C-14). En outre, les résonances à δ 61,2 (C-15), 66,6 (C-18) et 66,9 (C-17) sont imputables à trois oxyméthylènes.

Par ailleurs, si l'on admet la présence dans la molécule de formule brute $C_{26}H_{38}O_7$ d'une fonction cétone, de deux doubles liaisons trisubstituées et trois groupements acétoxy, alors celle-ci devra être un diterpène bicyclique. En effet, ces groupements chimiques contribuent pour six des huit cycles et/ou insaturations exprimés par la formule brute.

Les analyses des spectres RMN 2D, à savoir COSY 1H - 1H , TOCSY, HMQC et HMBC apportent des preuves supplémentaires aux précédents arguments et permettent d'établir que le produit **6.1** a un squelette de type labdane. Le spectre HMBC montre des taches de corrélation $^3J_{CH}$ et $^2J_{CH}$ entre les protons et les carbones suivants : H-2 (δ 2,75) et C-3 (δ 212,8), H-19 (δ 1,11) et C-3 (δ 212,8), C-4 (δ 51,2), C-5 (δ 52,3) et C-18 (δ 66,6), indiquant la position du groupement carbonyle en C-3 et celle d'un groupement acétoxyméthylène en C-4. Les corrélations COSY 1H - 1H et TOCSY entre H-5 (δ 1,76)/H-6 (2H, δ 2,1), H-6/H-7 (δ 5,8),

H-7/H-17a (δ 4,48) et H-7/H-9 (δ 1,86) permettent de fixer la position d'une double liaison trisubstituée entre C-7 (δ 128,1) et C-8 (δ 134,4) et celle d'un groupement acétoxyméthylène en C-8.

Les corrélations HMBC entre H-17 et C-7, C-8 et C-9 (δ 50,7) confirment les précédentes attributions et autorisent à fixer la chaîne latérale du diterpène sur le carbone C-9 de la partie bicyclique. En outre, le proton H-9 (δ 1,86) forme un système isolé de spins protoniques avec H-11 (δ 1,38 et 1,58) et H-12 (δ 1,94 et 2,16) d'après les taches de corrélation observées sur les spectres COSY ^1H - ^1H et TOCSY.

Une double liaison trisubstituée en C-13 (δ 141,7)/C-14 (δ 119,2) représente le prochain fragment constitutif de la chaîne latérale en considération des corrélations HMBC entre CH₃-16 (δ_{H} 1,67) et C-12 (δ 40,6), C-13 et C-14, entre le proton oléfinique H-14 (δ 5,3) et C-12. Cette chaîne latérale se termine par un groupement acétoxyméthylène par le fait que le carbone méthylénique C-15 (δ 61,2) montre une corrélation HMBC avec le proton oléfinique H-14 (δ 5,3).

La configuration relative du produit **6.1** a été déterminée par l'interprétation du spectre ROESY. Les corrélations ROESY entre H-18 et CH₃-20, et entre H-5 et CH₃-19 indiquent une orientation β -axiale de l'acétoxyméthylène en C-4 et une jonction *trans* des cycles A et B. La double liaison en C-13 admet la configuration *E* en se basant sur la corrélation observée entre H-15 et CH₃-16 d'une part, et par comparaison des données spectrales avec celles des produits analogues publiés dans la littérature^{88,89} d'autre part.

En conclusion, les résultats des études spectrales appuyées par les données de la littérature permettent d'établir la structure chimique du produit **6.1** comme étant 15,17,18-triacétoxy-labda-7,13*E*-dién-3-one. Elle est décrite pour la première fois.

⁸⁸ Urones, J.G., Marcos, I.S., Cubillo, L., Monje, V.A., Hernandez, J.M., Basabe, P. (1989) – Derivatives of malonic acid from *Parentucellia latifolia*. *Phytochemistry*, 28:651-653.

⁸⁹ Urones, J.G., Marcos, I.S., Oliva, I.M., Garrido, N.M., Hagget, J., Humphreys, V.M. (1995) – Labdane diterpenes from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry*, 38:663-666.

Les diterpènes de la série labdane sont assez répandus dans le genre *Vitex*. L'originalité du produit **6.1** repose sur le nombre et les positions des groupements acétoxy sur le squelette labdane.

V.2.2. Activité antiplasmodiale du produit 6.1 et de l'uvaol

Le nouveau diterpène **6.1** et l'uvaol (**6.2**) ont été évalués pour leur activité antiplasmodiale *in vitro*. Les deux produits ont été inactifs sur la souche chloroquino-résistante FCM29 de *Plasmodium falciparum*.

La toxicité rapportée pour *V. cauliflora* amène à poser la question : oui ou non, le nouveau diterpène **6.1** peut-il être le principe toxique de cette plante ? La faible quantité du produit isolé n'a pas permis de réaliser des tests de toxicité. Il s'avère difficile de trancher sur cette question car la littérature ne donne pas non plus d'informations concernant les activités biologiques des produits ayant des structures chimiques similaires comme le 3-oxo-labda-7,13*E*-dién-15-ol ou le labda-7,13*E*-diène-3,15-diol.^{89,90,91} Cependant, à l'exemple du labda-8(17),12-diène-15,16-dial, des diterpènes structurellement assez proches du produit **6.1** sont rapportés non cytotoxiques,^{92,93} et il est alors peu probable que ce dernier soit toxique.

Les résultats obtenus de *V. cauliflora* entrent dans le cadre du projet ICBG et ont été valorisés sous forme d'une publication dans la revue « Fitoterapia ».⁹⁴

⁹⁰ Miyamoto, F., Naoki, H., Naya, Y., Nakanishi, K. (1980) – Study of the secretion from a scale insect (*Ceroplastes ceriferus*) diterpenoids and sesterterpenoids. Tetrahedron, 36: 3481-3487.

⁹¹ Toki, M., Ooi, T., Kusumi, T. (1999) - Sesterterpenoids and Diterpenoids of the Wax Excreted by a Scale Insect, *Ceroplastes pseudoceriferus*. J. Nat. Prod., 62: 1504-1509.

⁹² Abdel-Kader, M., Berger, J.M., Slebodnick, C., Hoch, J., Malone, S., Wisse, J.H., Marga, C. M. W., Mamber, S., Kingston, D.G.I. (2002) – Isolation and Absolute Configuration of *ent*-Halimane Diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname Rain Forest. J. Nat. Prod., 65: 11-15.

⁹³ Zhou, B-N., Baj, N.J., Glass, T.E., Malone, S., Werkhoven, M.C.M., van Troon, F., Wisse, J.H., Kingston, D.G.I. (1997) – Bioactive Labdane Diterpenoids from *Renealmia alpinia* Collected in the Suriname Rainforest. J. Nat. Prod., 60: 1287-1293.

⁹⁴ Rasamison, V.E., Ranaivo-Harimanana, L., Cao, S., Pan, E., Ratovoson, F., Randriatafika, F., Rakotondrajaona, R., Andriantsiferana, R., Kingston, D.G.I. (2010) - A new labdane diterpene from *Vitex cauliflora* Moldenke from the Madagascar Rainforest. *Fitoterapia*, 81: 55-58.

VI. METABOLITES SECONDAIRES ISSUS de *Baseonema acuminatum* P. CHOUX

VI.1. Cadrage

Le genre *Baseonema* appartient à la famille Asclepiadaceae et comprend cinq espèces dont quatre se trouvent à Madagascar et une en Afrique orientale. *B. acuminatum* P. CHOUX est une liane vivace endémique, connue à Madagascar sous le nom vernaculaire « Hazomamy ». Elle est très employée en médecine traditionnelle dans les affections des voies respiratoires où les quintes de toux sont les symptômes.⁹⁵



Figure 13 : Photographie de *Baseonema acuminatum* P. CHOUX
Source : Stephan Rakotonandrasana (CNARP)

Cette plante a fait l'objet d'un certain nombre de travaux pharmacologiques au CNARP. L'extrait méthanolique des parties aériennes présente diverses propriétés biologiques *in vivo* et *in vitro*, telles qu'anti-anaphylactique, antipyrétique, anti-inflammatoire, antitussive, antibactérienne et antalgique.^{96,97} Cependant, un effet cardiaque a été mis en évidence au laboratoire. Sur le plan chimique, des oses simples ont été décrits

⁹⁵ Rabesa, Z.A (1986) - Pharmacopée de l'Alaotra. Fanantenana, Antananarivo, pp.128-129.

⁹⁶ Ratsimbason, M. (1987) - Etude des propriétés broncho-pulmonaires d'une Asclepiadacée (codée RP009) de Madagascar. Thèse de Doctorat de 3^{ème} Cycle. Université de Madagascar.

⁹⁷ Ratsimbason, M. (1989) - Etude biologique d'une plante anti-tussive codée RP009. Archives du CNARP, 8 :95-102

dans cette plante.⁹⁸ Des composés phénoliques possédant une propriété antimicrobienne sont rapportés dans un récent article.⁹⁹ Les résultats intéressants obtenus lors des essais pharmacologiques sont à l'origine du développement des recherches effectuées sur cette espèce au CNARP, notamment en ce qui concerne sa composition chimique. Nos travaux chimiques sur cette plante ont pour objectifs d'isoler les substances responsables de son activité anti-anaphylactique et son effet cardiaque, et de chercher des nouvelles entités chimiques. Les parties aériennes de *B. acuminatum* utilisées ont été récoltées à Ambatondrazaka en 1991.

Nos premiers résultats chimiques obtenus de cette plante correspondent à l'isolement de deux nouveaux glycostéroïdes de type pregnane dénommés baséonémosides A (7.1) et B (7.2). L'acide ursolique (7.3), le mélange des acides 23-hydroxyursolique (7.4) et 23-hydroxyoléanolique (7.5) ainsi que le β -sitostérol-3-O- β -D-glucoside (7.6) ont été également caractérisés. Leurs descriptions ont fait l'objet d'une publication dans la revue « Fitoterapia ».¹⁰⁰

VI.2. Résultats et discussion

Le partage liquide-liquide de l'extrait éthanolique (70 g) des parties aériennes (1 kg) de *B. acuminatum* a permis d'obtenir quatre fractions : hexanique (8 g), chloroformique (30 g), butanolique (12 g) et aqueuse (15 g). La fraction chloroformique a montré une activité anti-anaphylactique en inhibant la contraction d'origine immunologique de la trachée isolée de cobaye et un effet cardiaque en provoquant un effet inotrope positif suivi d'une arythmie sur les oreillettes isolées de rat.^{101,102}

⁹⁸ Razafimbelo J. (1981) - Contribution à l'étude de *Toddalia asiatica* Lamk (Rutaceés) et *Baseonema acuminatum* CHOUX (Asclépiadacées). Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Madagascar.

⁹⁹ De Leo, M., Braca, A., De Tommasi, N., Norscia, I., Morelli, I., Battinelli, L., Mazzanti, G. (2004) – Phenolic compounds from *Baseonema acuminatum* leaves and antimicrobial activity. *Planta Med.*, 70 :841-846.

¹⁰⁰ Rasamison, V.E., Okunade A.L., Ratsimbason, A.M., Rafidinarivo, E. (2001) - Pregnanes glycosides from *Baseonema acuminatum*. *Fitoterapia*, 72: 5-11.

¹⁰¹ Rasamison, V.E. (2000) – Contribution à l'étude chimique de *Baseonema acuminatum* P. CHOUX (Asclepiadacées): Mise en évidence de nouveaux glycostéroïdes, Thèse de Doctorat, Université d'Antananarivo, 102 pp.

¹⁰² Miarantsoa, G.H. (2001) – Etude exploratoire des effets cardiaques d'une Asclepiadaceae code RP009. Mémoire d'Ingénieur, Institut Supérieur Polytechnique de Madagascar, 48 pp.

Outre les produits **7.1-7.6**, la poursuite des travaux chimiques d'isolement sur la fraction chloroformique par des chromatographies sur colonne de silice et silice greffée C₁₈, suivies d'une chromatographie radiale et centrifuge à l'aide d'un chromatotron a conduit à l'isolement du produit **7.7** (5 mg). La structure du produit nouvellement isolé **7.7** est représentée à la figure 14. Les structures chimiques du baséonémocide A (**7.1**) et du baséonémocide B (**7.2**) sont reproduites à la figure 15 aux fins de comparaison.

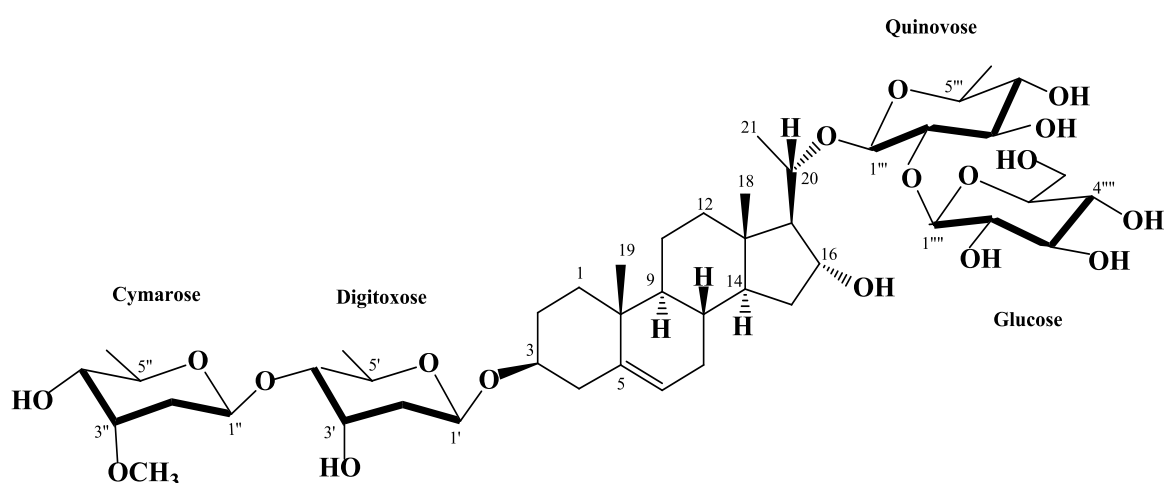


Figure 14 : Structure chimique du produit **7.7** issu de *B. acuminatum*

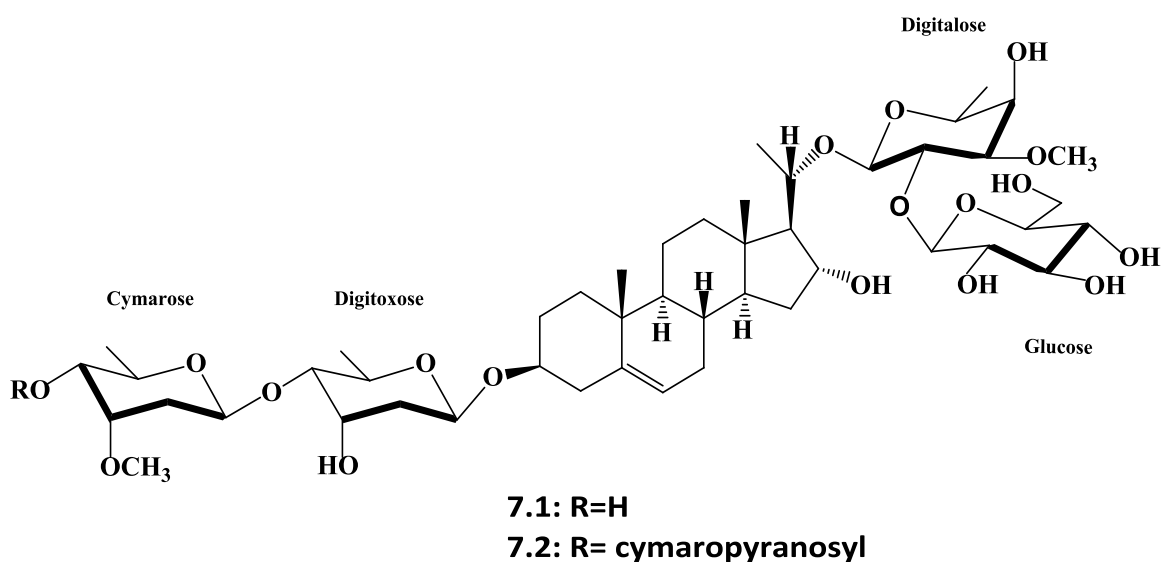


Figure 15: Structures chimiques des produits **7.1** et **7.2** issus de *B. acuminatum*

Identification structurale du produit 7.7

La structure chimique du produit **7.7** s'apparente à celle du baséonémoside A (**7.1**) en raison de la grande ressemblance de leurs spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C , et de Masse. Le produit **7.7** a comme formule brute $\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$ déterminée par spectrométrie de masse FAB à haute résolution et poids moléculaire égal à 916, soit 14 unités de masse en moins que baséonémoside A (**7.1**).

Les spectres de masse ESI-MS/MS/MS du produit **7.7** font apparaître des pics à m/z 795 $[\text{M}+\text{Na}-144]^+$ et m/z 665 $[\text{M}+\text{Na}-144-130]^+$, attribuables à la perte séquentielle d'un méthoxy-didéoxyhexose et un didéoxyhexose à partir de l'ion à m/z 939 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ d'une part, et des pics à m/z 777 $[\text{M}+\text{Na}-162]^+$ et m/z 631 $[\text{M}+\text{Na}-162-146]^+$, correspondant au clivage successif d'un hexose et d'un déoxyhexose à partir de l'ion pseudo-moléculaire, d'autre part. De plus, les signaux à m/z 317 $[\text{Aglycone} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$, m/z 299 $[\text{Aglycone} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$ et m/z 281 $[\text{Aglycone} + \text{H} - 3\text{H}_2\text{O}]^+$ suggèrent qu'il s'agit d'un hétéroside de même aglycone que baséonémoside A (**7.1**).

La comparaison des spectres RMN ^1H et ^{13}C du produit **7.7** et du baséonémoside A (**7.1**) révèle qu'ils ont la même génine glycosilée en C-3 et C-20, et le même diholoside attaché en C-3. Ils diffèrent essentiellement par l'absence de signaux assignés à un deuxième méthoxyle, indiquant le remplacement du D-digitalose par un déoxyhexose dans la chaîne osidique rattachée en C-20 du produit **7.7**. Les données de la RMN 2D (COSY ^1H - ^1H , HMQC, HMBC) du produit **7.7** appuyées par celles de la littérature sur les monosaccharides¹⁰³ ont permis d'identifier le déoxyhexose au D-6-déoxyglucose (ou D-quinovose).

L'apparition à champ faible du déplacement chimique du carbone C-2''' (δ 78,6) du D-quinovose sur le spectre RMN ^1H suggère une liaison glycosidique de type 1→2. La présence de taches de corrélation sur le spectre HMBC entre H-1''' (δ 4,50) du D-quinovose et C-20 (δ 80,4) de l'aglycone, entre H-1'''' (δ 4,80) du glucose et H-2''' (δ 78,6) du D-quinovose, confirme la séquence des sucres dans la chaîne osidique fixée en C-20 de l'aglycone.

¹⁰³ Bock, K., Pedersen, C. (1983) – Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., vol. 41, Academic Press, Inc., 27-65

L'ensemble de ces observations permet d'avancer la structure chimique suivante pour le produit **7.7** : Δ^5 -prégnène-3 β ,16 α ,20(S)-triol-3-O-[β -D-cymaropyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-digitoxopyranoside]-20-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-quinovopyranoside], dénommée baséonémoside C. Elle est décrite pour la première fois.

Comme baséonémoside A (**7.1**) et baséonémoside B (**7.2**), baséonémoside C (**7.7**) n'a pas montré de particularités concernant ses composantes structurales puisque la génine et les monosaccharides sont des molécules déjà connues. Seul le mode d'agencement de ces composés entre eux fait du glycostéroïde **7.7** une molécule originale.

Au vu de ces résultats, *B. acuminatum* est une source de nouvelles entités chimiques, plus précisément des glycostéroïdes de type prégrane. Ces derniers sont rapportés dans de nombreux genres de la famille Asclepiadaceae et possèdent généralement dans leurs parties osidiques des 2,6-didéoxysucres.^{104,105}

La faible quantité du produit isolé n'a pas permis de réaliser des tests biologiques. Cependant, les résultats de nos travaux antérieurs ont montré que l'activité anti-anaphylactique de cette plante se retrouve au niveau des fractions riches en triterpènes pentacycliques tandis que sa toxicité cardiaque est localisée dans des fractions contenant les glycostéroïdes.^{101,106}

Les travaux de recherche sur *B. acuminatum* ont été menés en partenariat avec Department of Biology, Washington University (USA) et Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute (USA) et ont donné lieu à une publication dans la revue « Fitoterapia ».¹⁰⁷

¹⁰⁴ Warashina, T., Noro, T. (1995) - Steroidal glycosides from the root of *Cynanchum caudatum* M. Chem. Pharm. Bull., 43: 977-982.

¹⁰⁵ Rasoanaivo, P., Kaneda, N., Kinghorn, A.D., Farnsworth, N.R. (1991) - Folotoside A, a new pregnane glycoside from *Folotsia sarcostemmoides*. J. Nat. Prod., 54: 1672-1676.

¹⁰⁶ Ratsimbason, A.M., Rasamison, V.E., Razafindrabeaza, T., Rahelinirina, L. (1997-1998) – Test antianaphylactique des extraits d'une Asclepiadaceae : *Baseonema acuminatum*. Revue Med. Pharm. Afr., 11-12 : 143-150

¹⁰⁷ Rasamison, V.E, Cutrone, J.Q., Okunade, A.L. (2002) – Additional pregnane glycoside from *Baseonema acuminatum*. Fitoterapia, 73: 442-443.

CONCLUSION PARTIELLE

Dans le chapitre qui vient d'être présenté, mes travaux de recherche se rapportent aux cinq plantes suivantes : *Melicope madagascariensis*, *Diospyros gracilipes*, *Turraea sp.*, *Vitex cauliflora* et *Baseonema acuminatum*. Les résultats y afférents sont les fruits de plusieurs collaborations avec des Chercheurs d'autres institutions nationales et internationales. Ils ont donné lieu à cinq publications parues dans des revues de niveau international et dont je suis le premier auteur. Le choix de ces plantes a été décidé selon une approche systématique par criblage d'activités biologiques. La méthode bio-guidée a été appliquée pendant les travaux chimiques d'isolement. Cependant, des fractions inactives et non testées ont été également examinées dans de nombreux cas, à des fins purement phytochimiques et/ou chimiotaxonomiques.

Par cette approche phytochimique mise en œuvre, les travaux de recherche effectués sur ces cinq plantes ont abouti à l'isolement et l'identification de vingt-six produits, dont quatre ont des structures chimiques nouvelles. Un des produits nouveaux, la turraenine issue de *Turraea sp.* (Meliaceae) est le premier exemple naturel de triterpénoïdes sous forme dimérique dans laquelle les deux monomères sont reliés par un pont azoté. Toutefois, les produits connus ont été caractérisés pour la première fois dans les plantes examinées.

La deuxième étape des études entreprises sur ces plantes a consisté en la valorisation des métabolites secondaires isolés par la recherche d'activités biologiques et la description de leur intérêt chimiotaxonomique. 07 produits ont montré l'une au moins des propriétés suivantes : antiplasmodiale sur les souches chloroquino-résistante FCM29 ou multi-résistante Dd2 de *Plasmodium falciparum*, antimicrobienne sur *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans*, et cytotoxique sur les lignées de cellules cancéreuses humaines HT-29 du côlon et A2780 de l'ovaire. La mise en évidence de classes particulières de substances naturelles a permis de soutenir la classification de *Diospyros gracilipes* et la reclassification de *Melicope madagascariensis* au point de vue chimiotaxonomique.