



Symposium « BioMad 2009 »
Biodiversité-Valorisation des Substances Naturelles

Université d'Antananarivo
Madagascar

13-14-15 Octobre 2009



SESQUITERPENES A NOYAU
CALAMENENE ISSUS DE
Tarenna madagascariensis
(RUBIACEAE)

Présenté par **Pr. Yvonne RANARIVELO**

LCOSM-Département de Chimie Organique-
Faculté des Sciences-Université d'Antananarivo



PLAN

Introduction

Matériel et méthodes

Résultats et discussion

Conclusion



***Tarenna madagascariensis* (Baill) Homolle
(Rubiaceae) antérieurement *Enterospermum*
Révisé *Coptosperma madagascariensis***



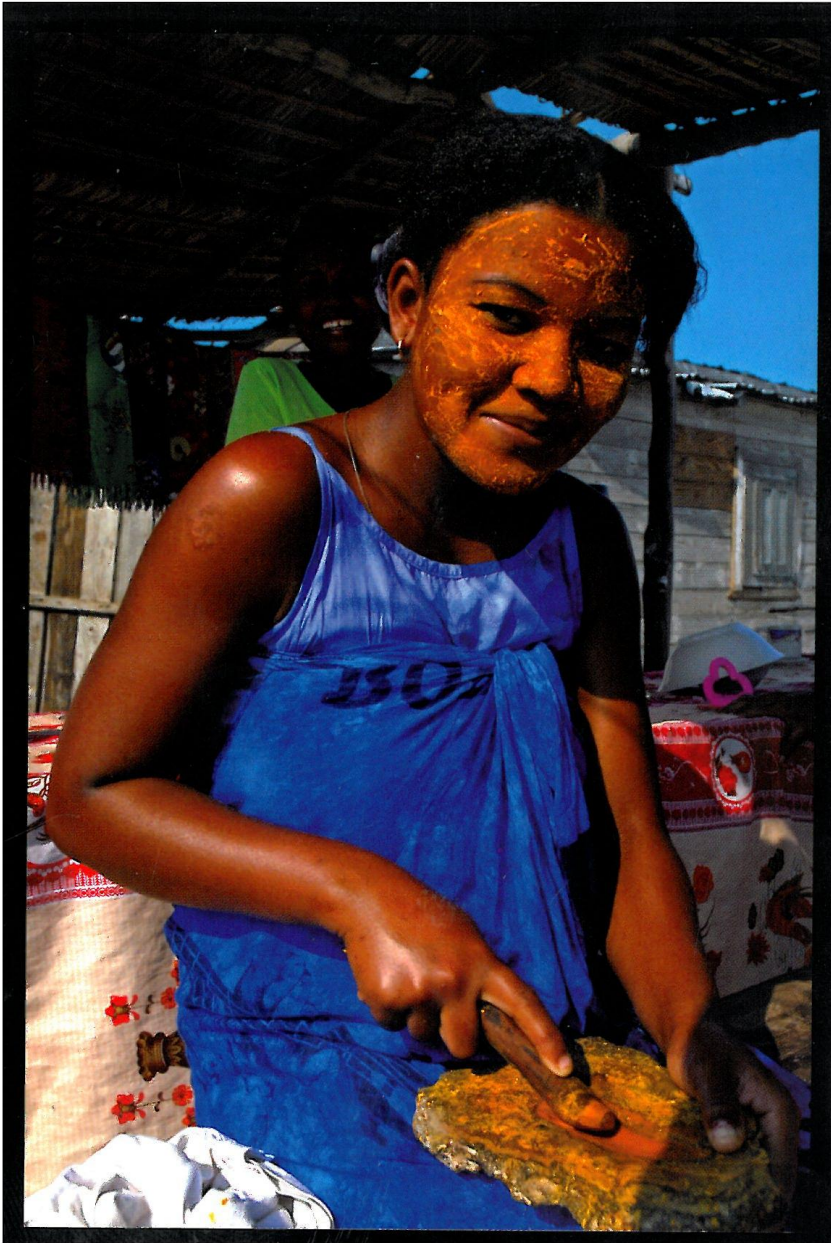
Nom vernaculaire: **Masonjoany**



PBZT N°2592

Usage traditionnel
Produits de beauté
dans les masques
faciaux pour adoucir
la peau de visage





Parties utilisées
tiges écrasées

Le genre *Tarenna* (Rubiaceae)

- Environ 200 espèces d'arbres et d'arbustes tropicaux appartiennent au genre *Tarenna*
- Les métabolites secondaires d'un nombre très restreint d'espèces de *Tarenna* ont été étudiés à ce jour.

– *T. graveolens*

– *T. kotoensis* var. *gyokushinka*:

– *T. vanprukii*

– *T. bipindensis*

} iridoïdes

} glucosidiques

} alcaloïdes

} indoliques

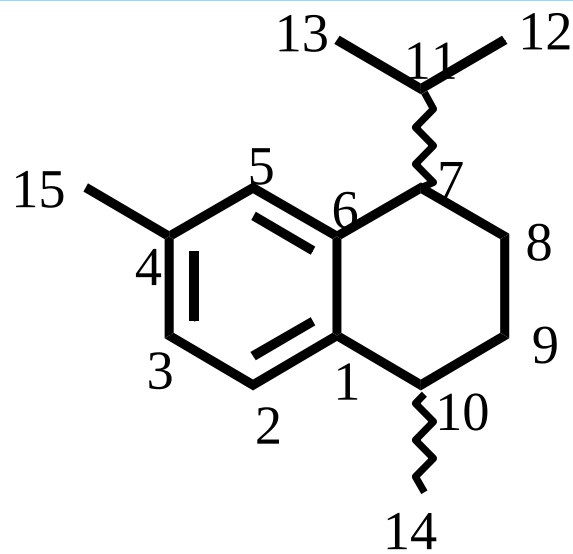
Partie Phytochimie

- Extraction au CH_2Cl_2 puis au MeOH
- Fractionnement de l'extrait au CH_2Cl_2
- Purification, Isolement
- Détermination de structure: configuration absolue et relative des molécules

Partie Biologie

Tests anticancéreux *in vitro*

- sur les extraits bruts au CH_2Cl_2 et au MeOH
- sur chaque produit pur isolé



**Tiges écrasées
et pulvérisées (2,2kg)**

- 1^{ère} Extraction au CH_2Cl_2
T° ambiante, 12h
agitation mécanique
- Filtration /verre fritté

Filtrat 1

marc

Rassemblés,
évaporés sous vide

Filtrat 2

2^{ème} extraction
au CH_2Cl_2 ,4h

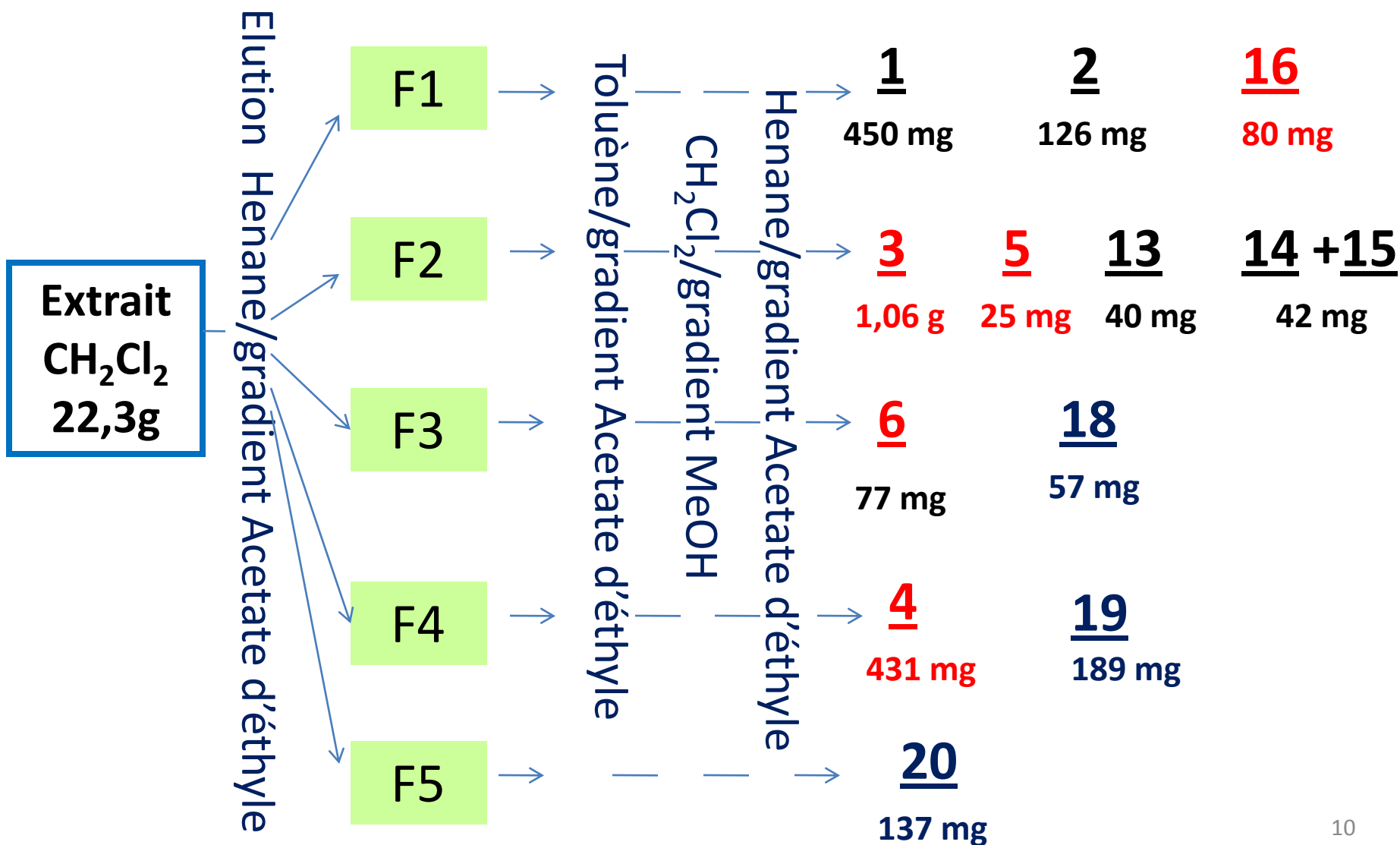
marc

Extraction
au MeOH

**Extrait CH_2Cl_2
22,3g (Rdt ~ 1%)**

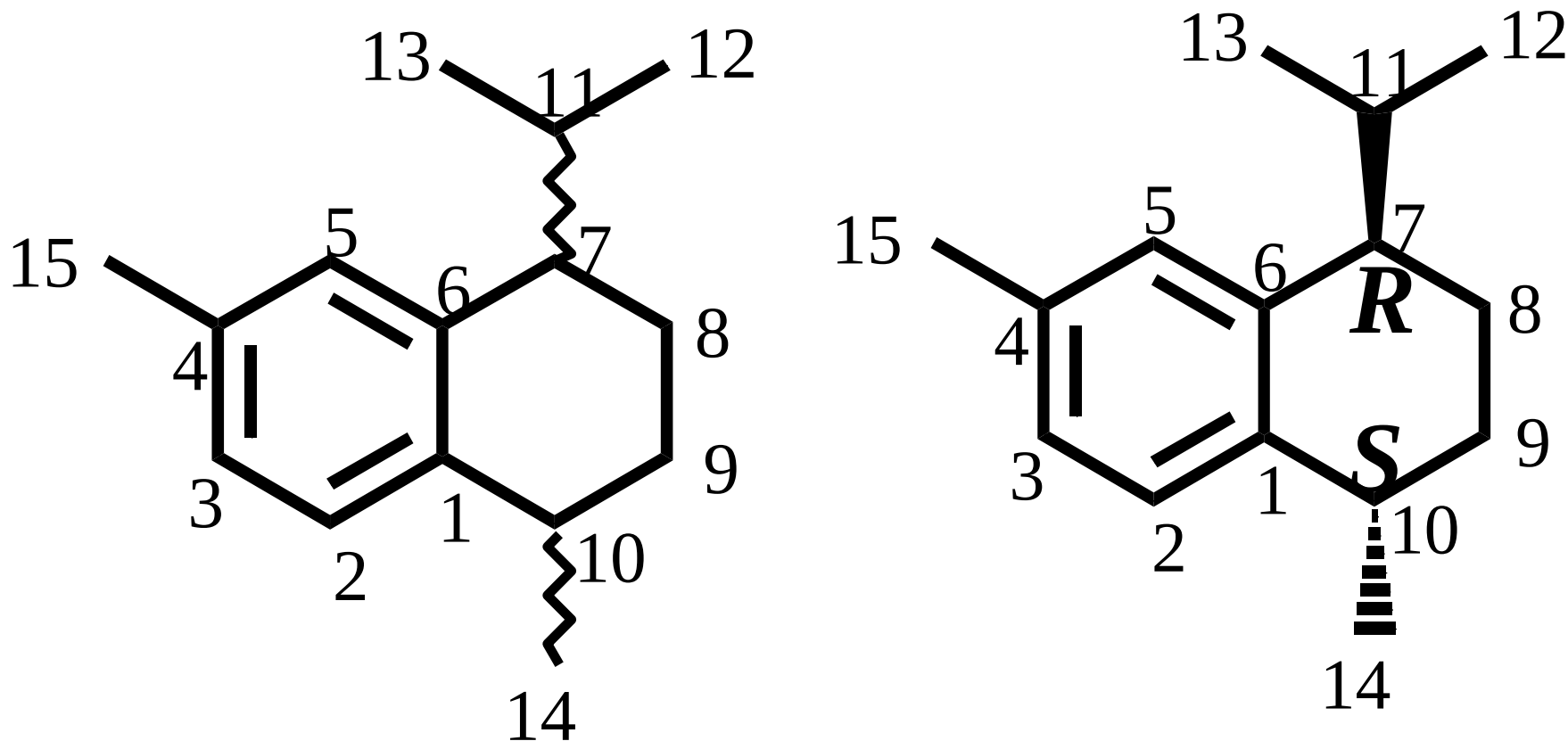
Extrait MeOH

Fractionnement par chromatographies successives sur colonne de silice

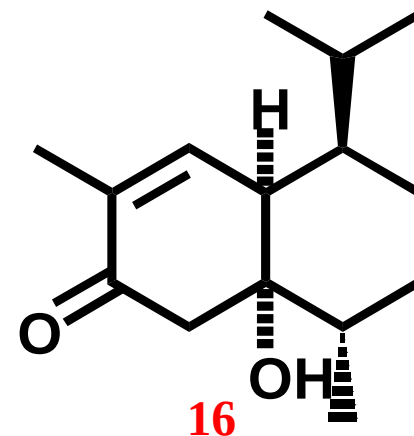
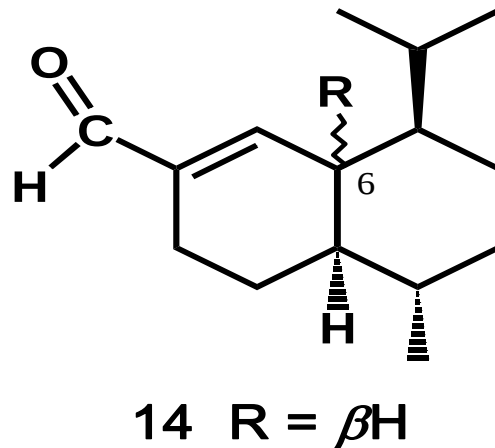
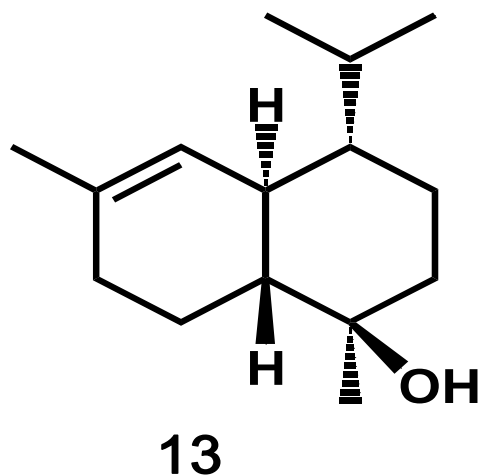
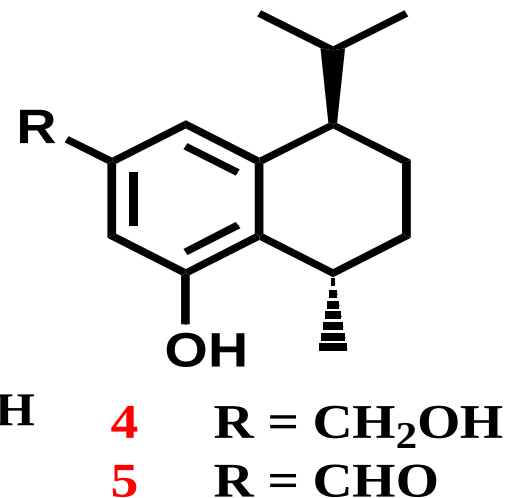
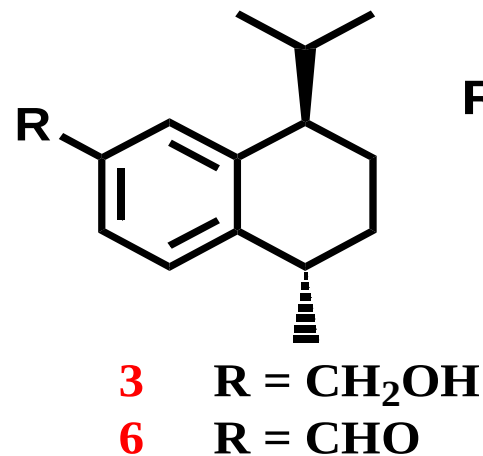
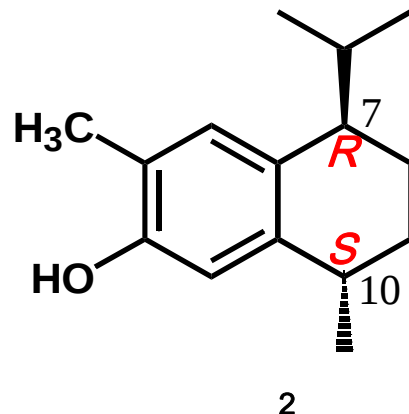
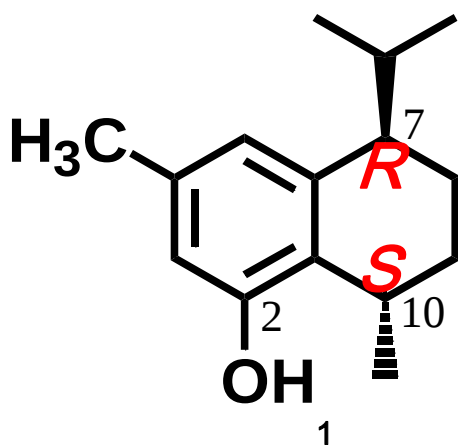


T. madagascariensis

10 sesquiterpenes à noyau calamenene (dont 05 nouveaux)

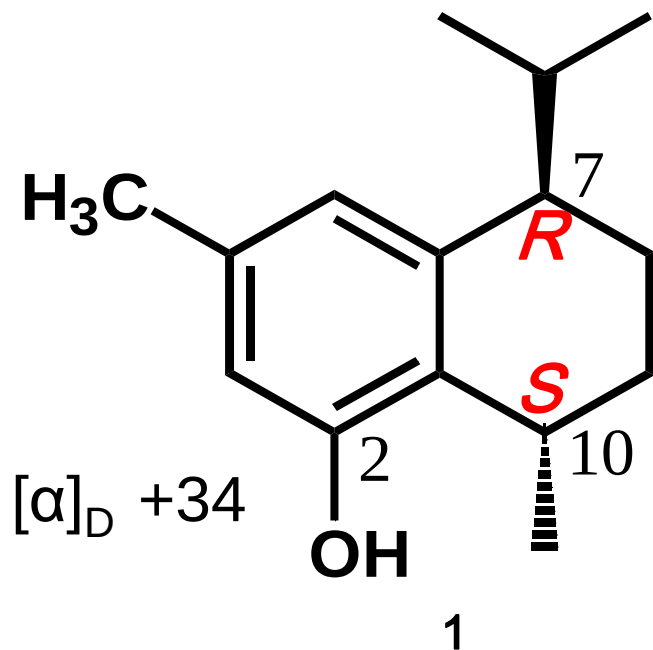


Sesquiterpènes de *Tarenna madagascariensis* (Rubiaceae)



1

(+)-(7*R*,10*S*)-2-hydroxycalamenene



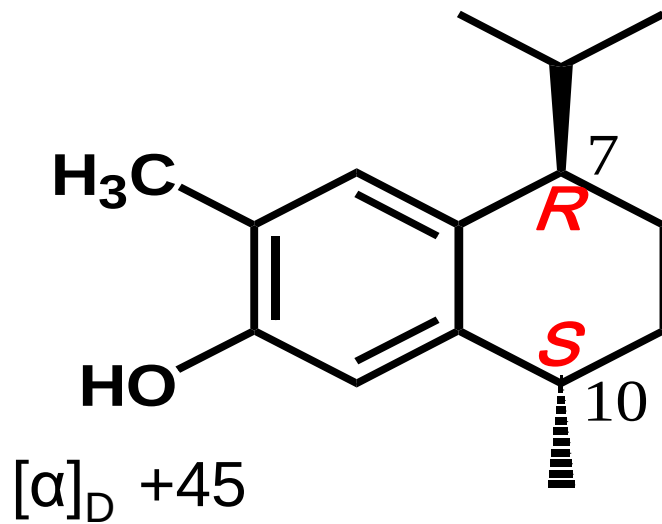
EIMS *m/z* 218 (100, M^+) RMN 1H , ^{13}C

Antérieurement isolé de
plusieurs plantes
du genre *Dysoxylum*
ainsi que de nudibranche
Leminda millera

Mc Phail *et al.*, J.Nat.Prod., **64**, 1183, 2001

2

(+)-(7*R*,10*S*)-3-hydroxycalamenene



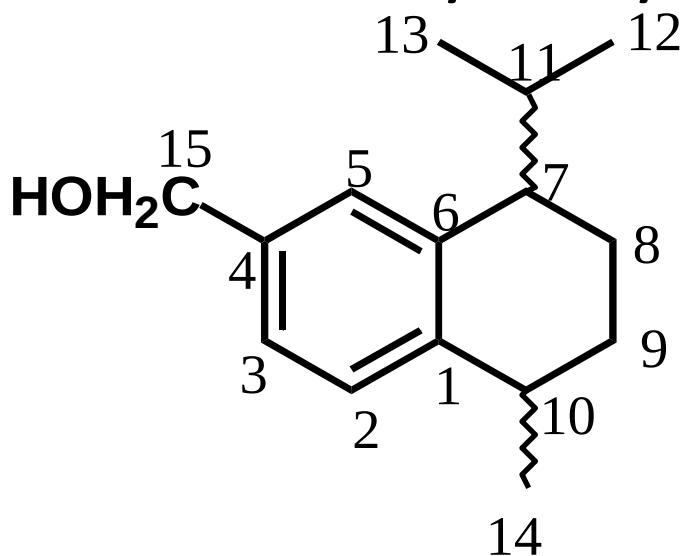
EIMS *m/z* 218 (15, M^+)
RMN 1H , ^{13}C

Nabeta *et al.*, Phytochemistry, 32, 117 (1993)

Dérivé *trans*

3 $[\alpha]_D +62$ (CHCl_3 ; c 0.49); EIMS m/z 218 (15, M^+)

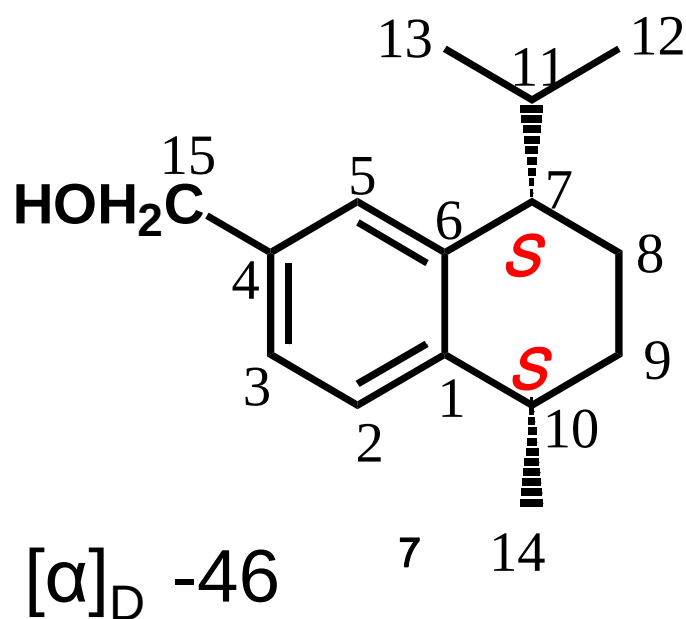
- $[\alpha]_D +62$, Données spectrales RMN 2D (1H-1H COSY, HMQC, HMBC) suggèrent un dérivé 15-hydroxy-calamenene



Stéréochimie ??

3

- Les données spectrales sont identiques à celles du composé isolé de *Juniperus formosana* var. *concolor* pour lequel une configuration *Cis* a été proposée



(-)-(7S,10S)-15-hydroxycalamenene

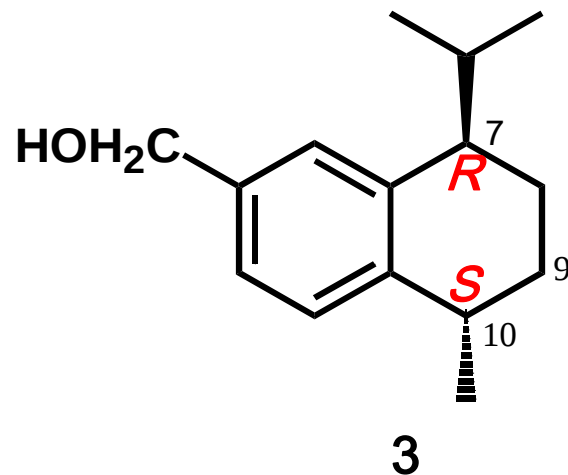
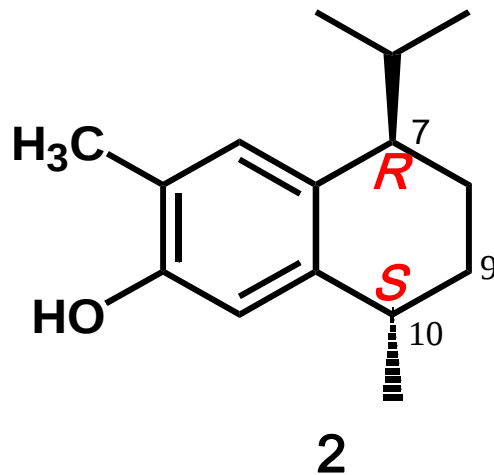
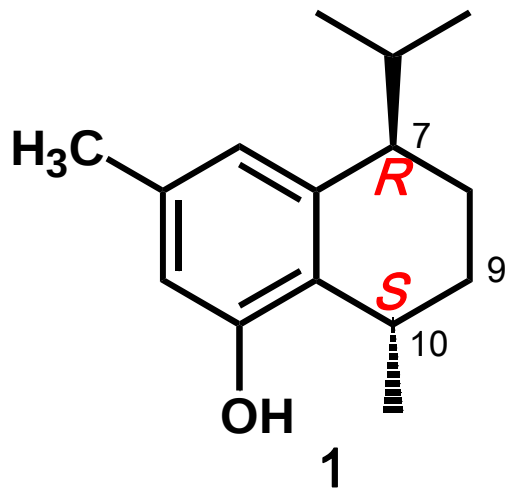
Kuo *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 2150, (1993)

Stéréochimie ??

N° C	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	6	
1	126.2	142.0	142.6	128.9	138.0	150.9	
2	153.2	113.0	124.2	153.6	154.3	128.0	
3	113.4	151.5	126.9	111.2	110.9	126.8	
4	135.0	120.8	137.7	137.9	134.0	134.1	
5	122.9	130.5	127.2	120.6	125.9	130.1	
6	141.2	132.0	140.4	141.6	142.3	141.3	

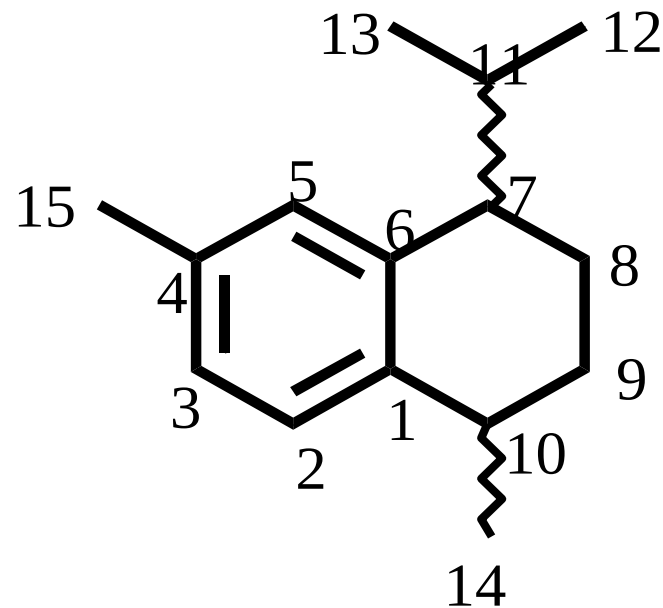
N° C	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	
7	43.2	43.1	43.9	43.1	43.1	43.9	
8	19.2	21.6	21.3	19.0	18.9	21.3	
9	27.2	30.8	30.6	27.0	26.6	30.2	
10	26.7	32.6	32.7	26.8	27.5	33.6	
11	33.3	31.9	31.9	33.2	33.3	32.1	

N° C	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	
12	19.7	17.2	17.4	19.6	19.5	17.5	
13	22.2	21.2	21.4	22.1	22.0	21.3	
14	21.3	22.2	22.3	21.1	20.8	22.3	
15	21.2	15.6	65.5	65.4	192.9	192.7	



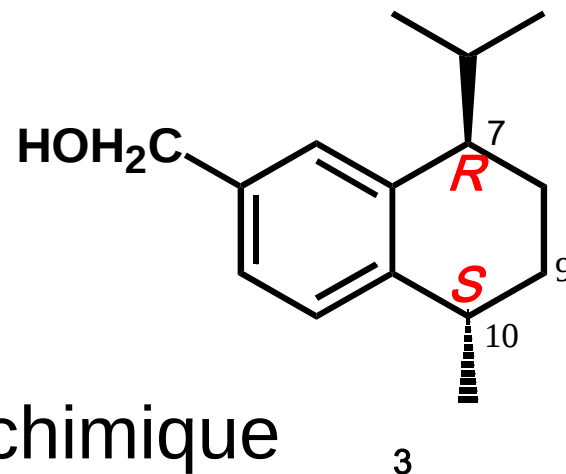
- En RMN ^{13}C , le signal du C-9 du composé **3** apparaît à $\delta=30.6$ suggérant un *trans* plutôt qu'un *cis*-15-hydrocycalamene

- D'ailleurs, la comparaison du pouvoir rotatoire de plusieurs dérivés du calamenene montre que le signe de $[\alpha]_D$ est en relation avec la configuration absolue en C-7 quelle que soit celle en C-10
- Tous les dérivés de calamenene qui ont C-7 (*R*) sont dextrogyres alors que ceux qui ont C-7 (*S*) sont lévogyres

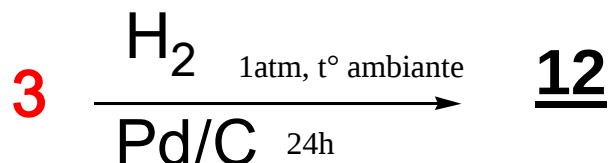


		$[\alpha]_D$	δ C-9
➤ (+)-(7 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-3-hydroxy calamenene	<i>cis</i>	+27	28.6
➤ (+)-(7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-3-hydroxy calamenene	<i>trans</i>	+59	30.8
➤ (+)-(7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-3-methoxy calamenene	<i>trans</i>	+42	30.7
➤ (+)-(7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-calamenene	<i>cis</i>	+43	28.9
➤ (-)-(7 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-3-methoxy calamenene	<i>cis</i>	-29	28.8
➤ (-)-(7 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-calamenene	<i>trans</i>	-73	31.0

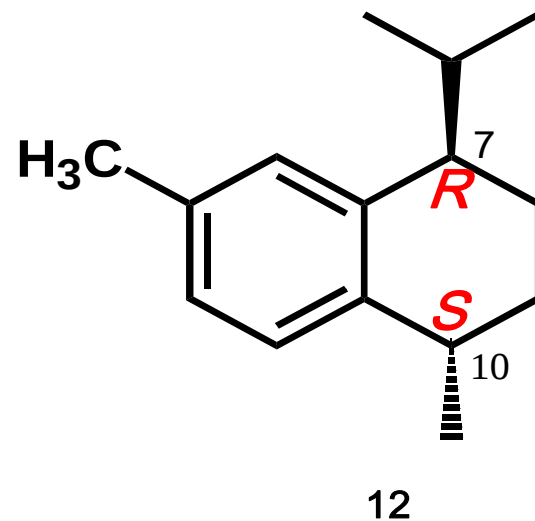
Le composé **3** $[\alpha]_D +62$
dextrogyre a donc comme structure
(+)-(7R, 10S)-15-hydroxycalamenene



Structure confirmée par corrélation chimique



Les données du composé **12** obtenu
(EIMS, RMN ^1H et ^{13}C) sont
identiques à celles décrites
par Nakashima *et al.*, dans
Molecules, **7**, 517 (2002)
soit (+)-(7R, 10S)-calamenene



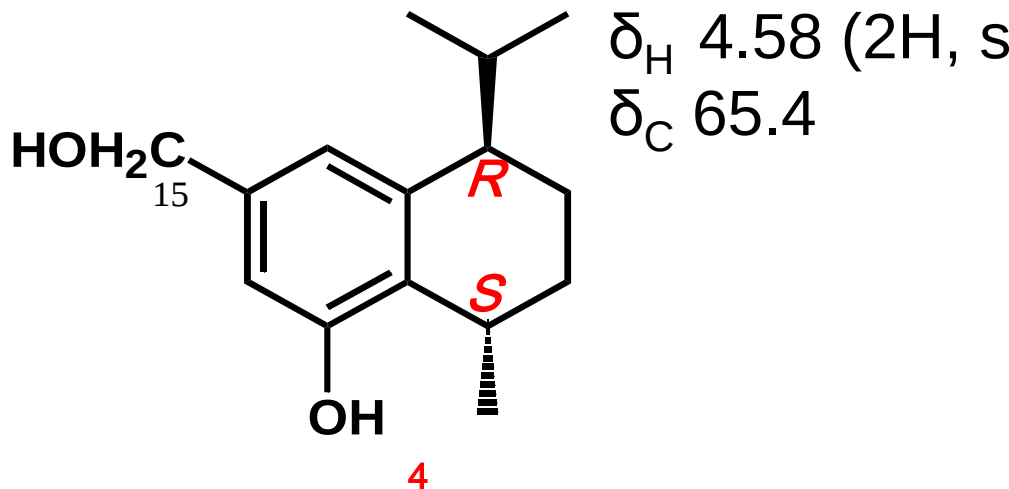
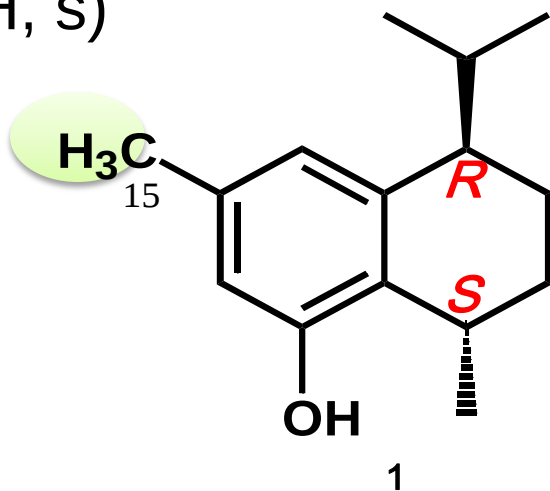
3 Enantiomère (+) d'origine naturelle décrit ici pour la 1^{ère} fois

4 $[\alpha]_D +22$

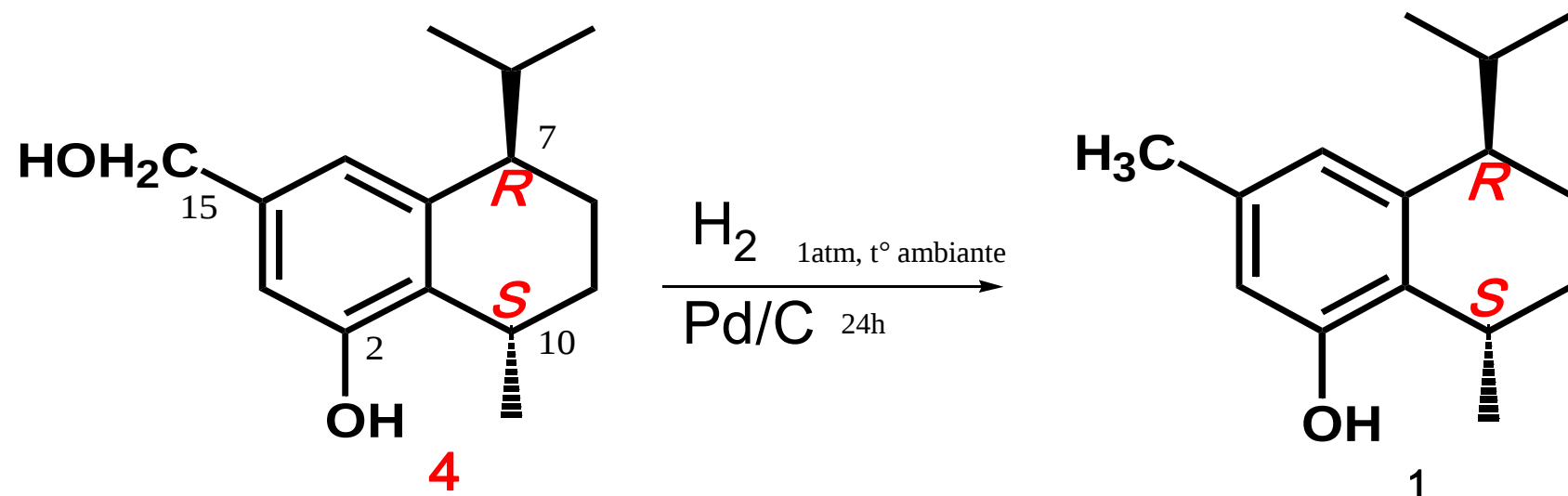
- HREIMS ($C_{15}H_{22}O_2$)
- En IR , on note la présence de 2 bandes d'absorption à 3383 et 3142 cm^{-1} attribuables aux groupements OH
- La comparaison des données RMN 1H et ^{13}C des composés **1** et **4** montre que **4** est un dérivé hydroxylé de **1**.

Les données sont similaires sauf pour le méthyle aromatique:

δ_H 2.27 (3H, s)
 δ_C 21.2



Structure de 4 confirmée par corrélation chimique

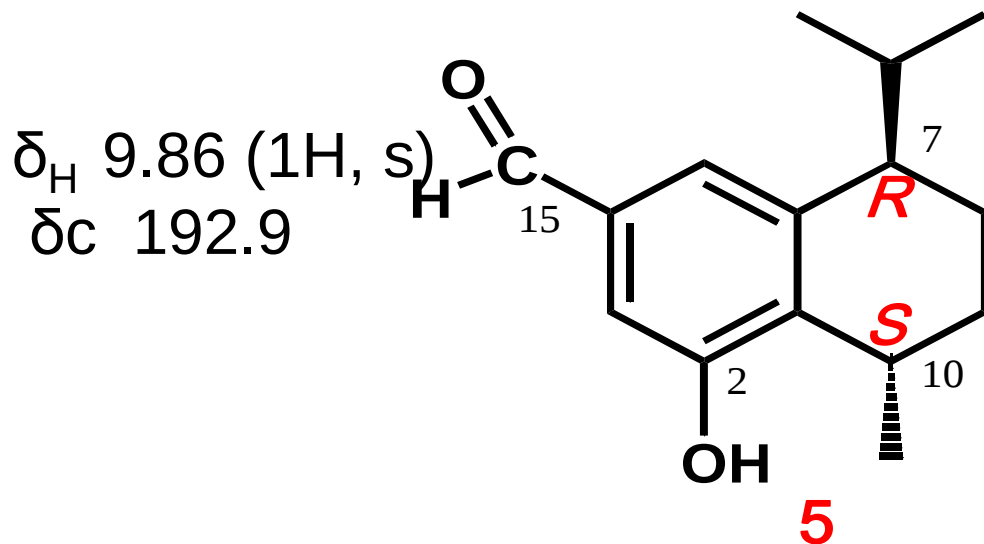


4 (+)-(7*R*,10*S*)-2,15-dihydroxycalamenene

Produit naturel nouveau

5 $[\alpha]_D +66$

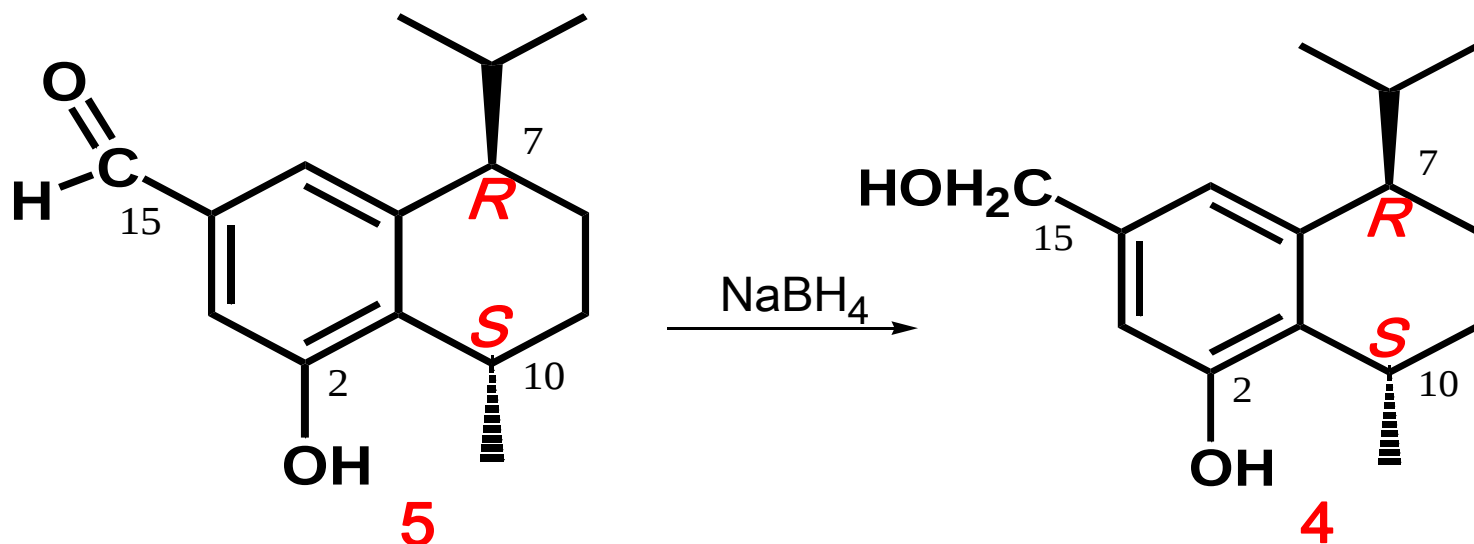
- HREIMS ($C_{15}H_{20}O_2$)
- En IR , on note la présence de la bande d'absorption à 3383 cm^{-1} attribuable à un groupement OH et de la bande d'absorption à 1681 cm^{-1} attribuable à un groupement carbonyle
- Les données RMN 1H et ^{13}C sont similaires à celles des composés 1 et 4 sauf maintenant la présence des signaux caractéristiques d'un groupement aldéhyde en C-15



Produit naturel
nouveau

5 (+)-(7*R*,10*S*)-2-hydroxy-15-calamenal

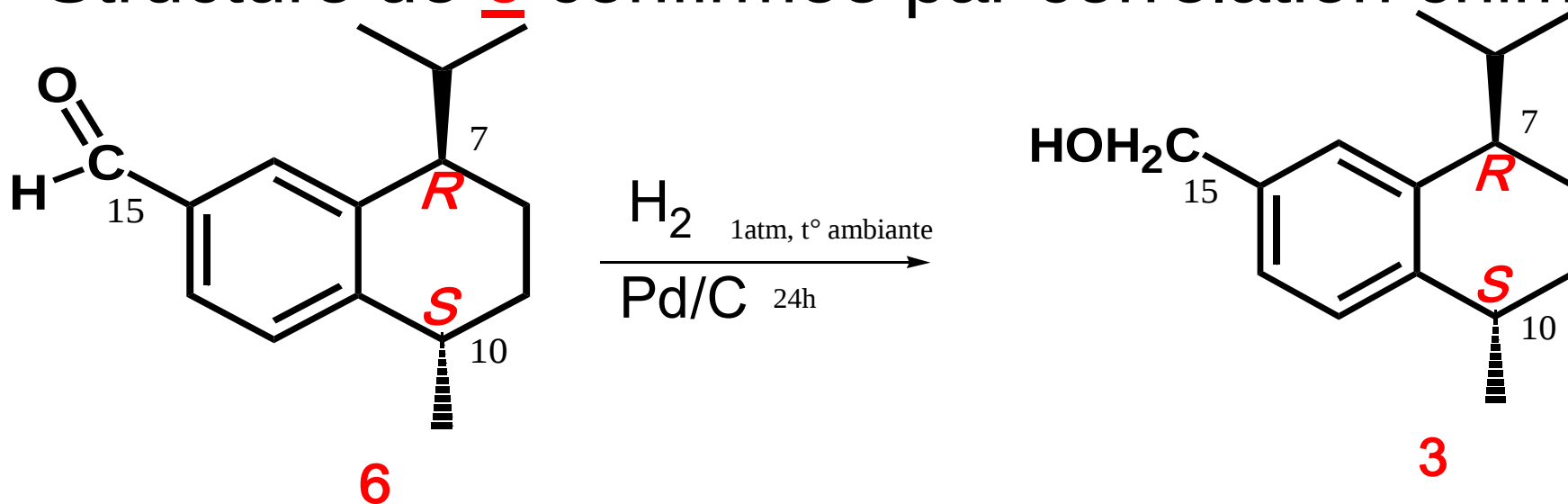
Structure de **5** confirmée par corrélation chimique



6 $[\alpha]_D +62$

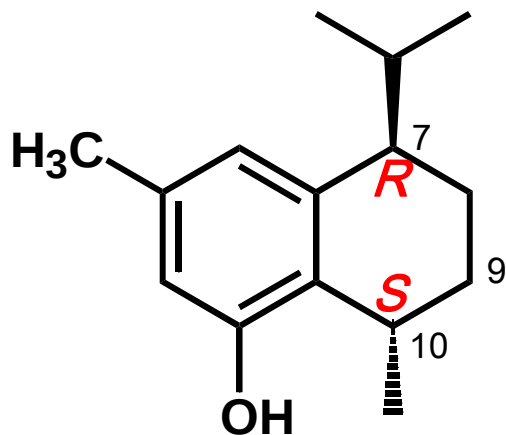
- HREIMS ($C_{15}H_{20}O$)
- Le spectre IR montre la présence de la bande d'absorption ($\nu_{C=O}$ à 1699 cm^{-1})
- Les spectres RMN 1H et ^{13}C donnent les signaux (δ_H 9.95 et δ_C 192.7) d'un groupement aldéhyde.
- La comparaison des données spectrales de 6 à celle du composé 3 suggère que 6 est l'aldéhyde correspondant à 3

Structure de 6 confirmée par corrélation chimique

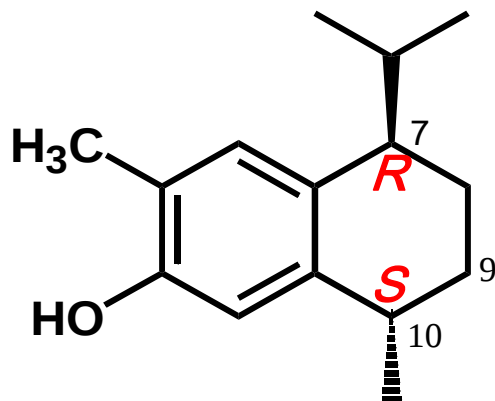


6 (+)-(7*R*,10*S*)-15-calamenal

La présence du 15-calamenal dans les huiles essentielles de *Juniperus oxycedrus* a été décrite par Barrero *et al*, *Flav. Frag. J.*, **8**, 185, (1993) mais sans précision sur la stéréochimie, puisqu'ils ont déterminé la structure par GC/MS

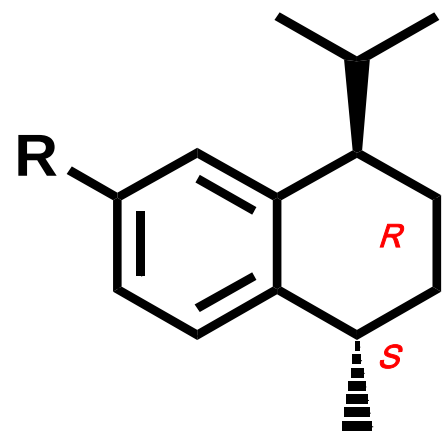


1



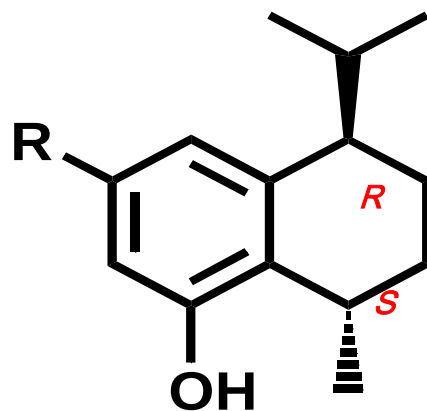
2

Dérivés de calamenene



3 R = CH₂OH

6 R = CHO



4 R = CH₂OH

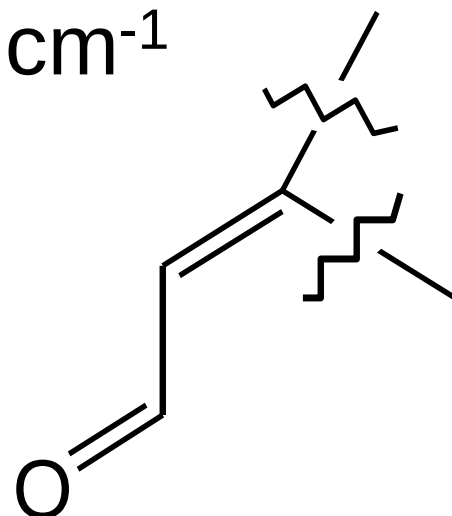
5 R = CHO

16 $[\alpha]_D -85$ (CHCl_3 ; c 1.6)

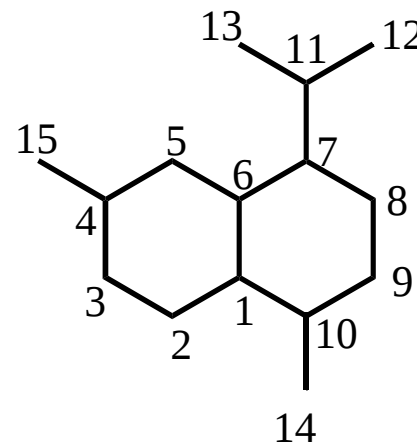
- HREIMS ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$)
- Le spectre IR montre la présence de la bande d'absorption

d'un OH (ν_{OH} à 3372 cm^{-1}) $\text{---}\text{O---H}$

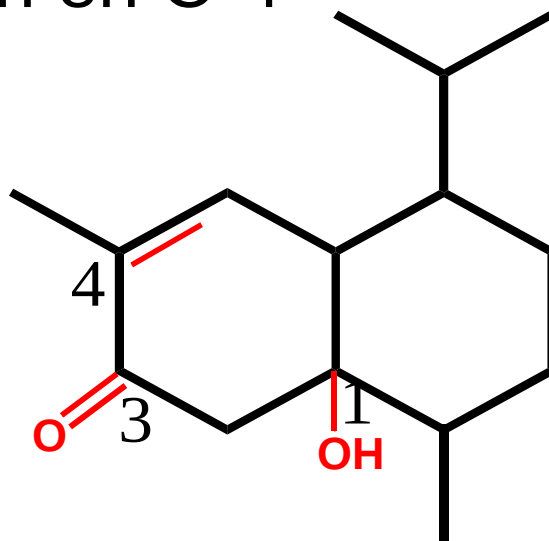
et d'un carbonyle conjugué à 1683 cm^{-1}



L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C montre que **16** est un dérivé de calamenane



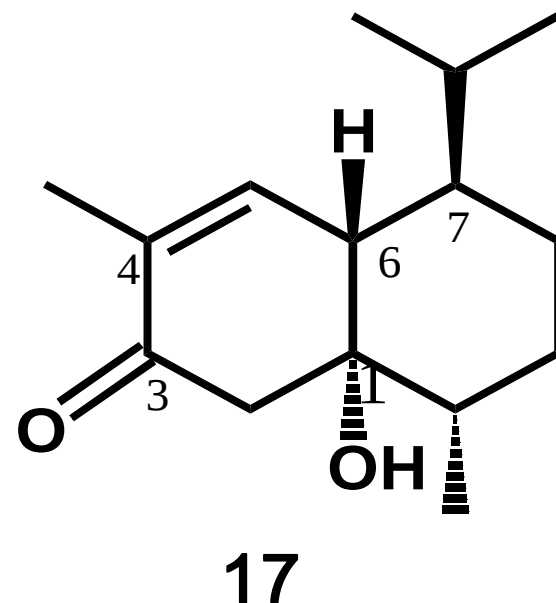
portant un OH en C-1, un carbonyle en C-3 et une double liaison en C-4



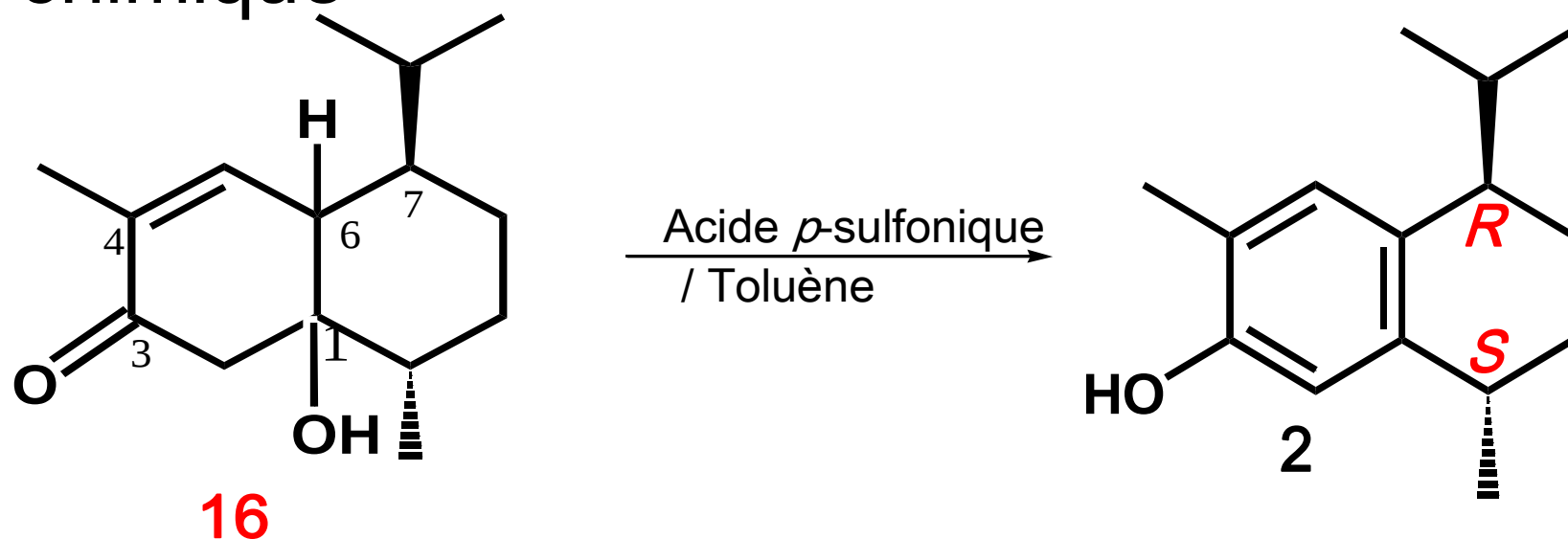
Künig et Wright rapportent dans *Magn. Res. Chem.*, **33**,178, (1995) l'isolement du cubenol-3-one **17** à partir de l'algue brune *Dictyopteris delicatula* ayant la même constitution que le composé **16** .

Cependant leurs spectres RMN ne sont pas superposables

ce qui indique que ce sont des diastéréoisomères.



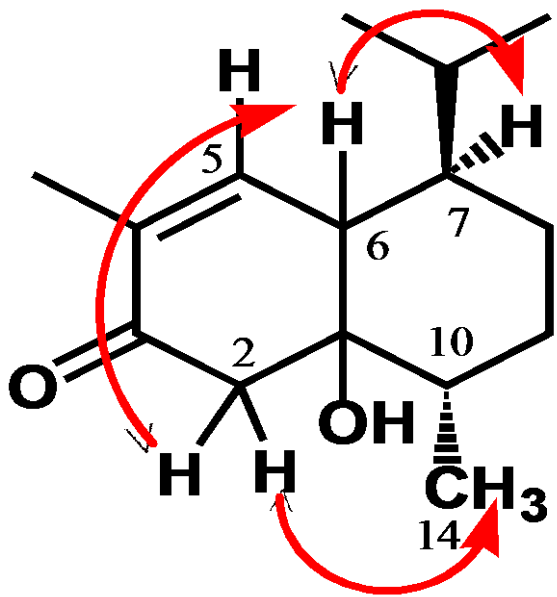
Structure de 16 déterminée par corrélation chimique



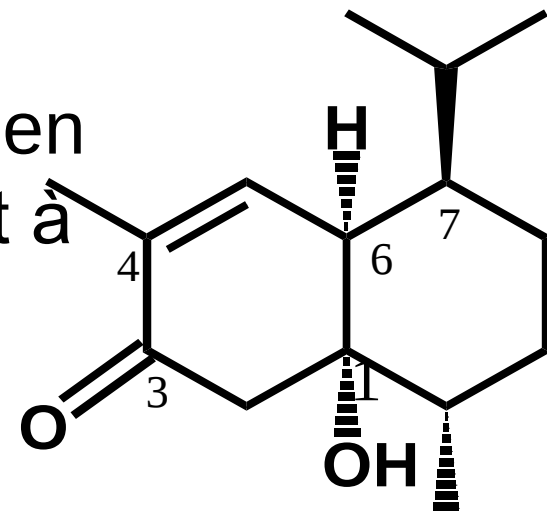
En C-7 la configuration est $7R$

En C-10 la configuration est $10S$)

Les corrélations en NOESY sont observées pour H-6/H-7, H-6/H-2ax, et H-2eq/H₃-14 et pas de corrélation entre H-5 et H-7 ni entre H-2eq et H-10



- Jonction *cis* des cycles
- H-6 et H-7 sont en *cis* l'un par rapport à l'autre



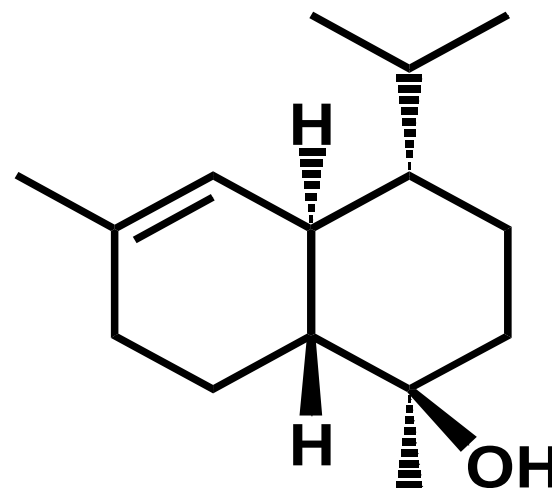
16

(+)-(1*S*,6*R*,7*R*,10*S*)-1-hydroxy-3-oxo-amorph-4-ène

16 Produit naturel nouveau

13 $[\alpha]_D -23$ (CHCl_3 ; c 2.7)

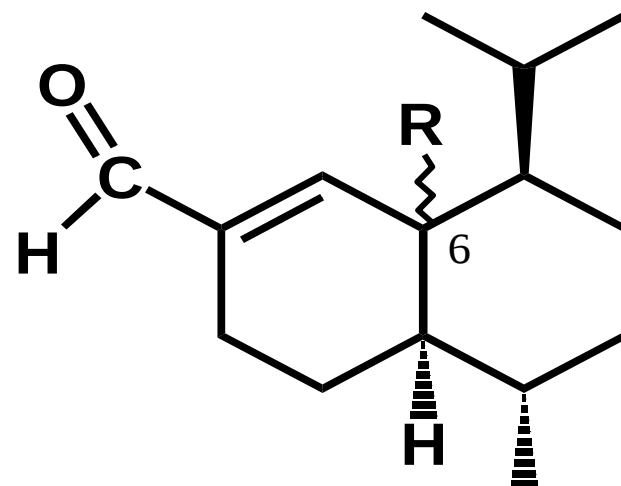
- identifié au (-)- α -cadinol ,
sesquiterpène présent dans
plusieurs plantes et huiles
essentielles .



13

14 et 15

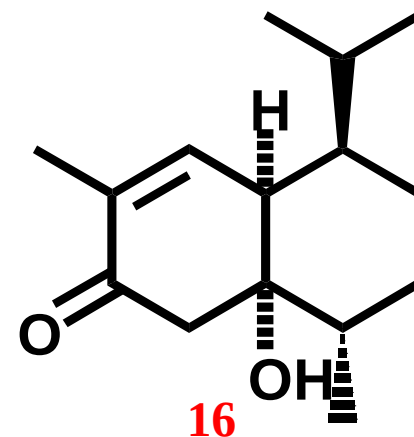
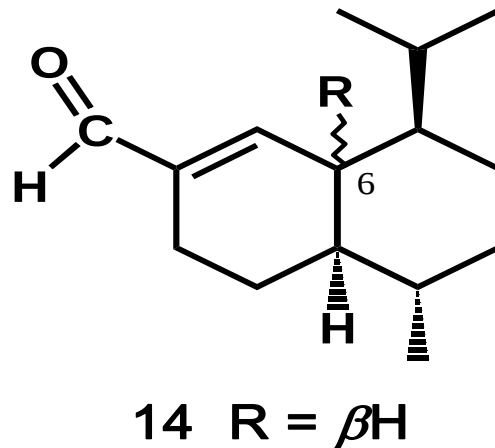
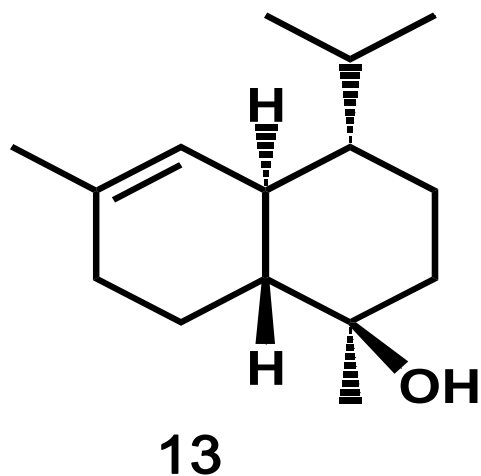
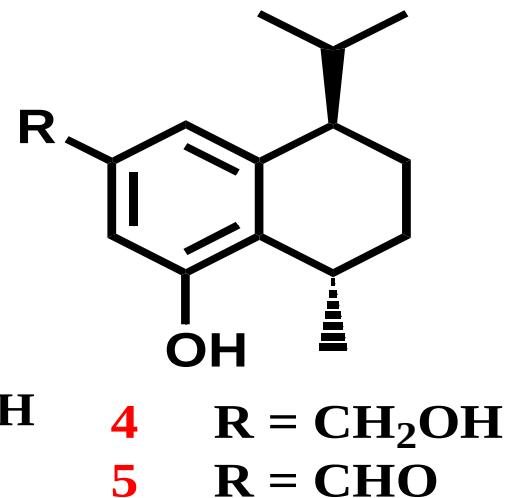
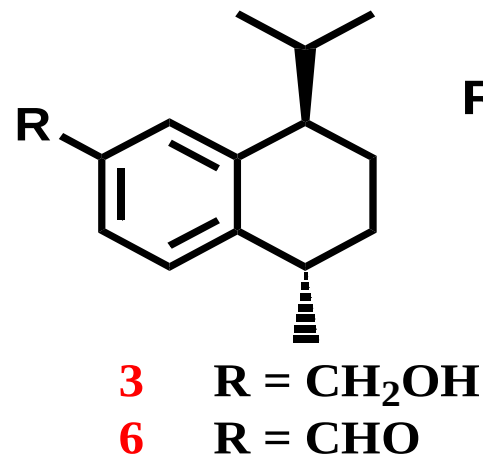
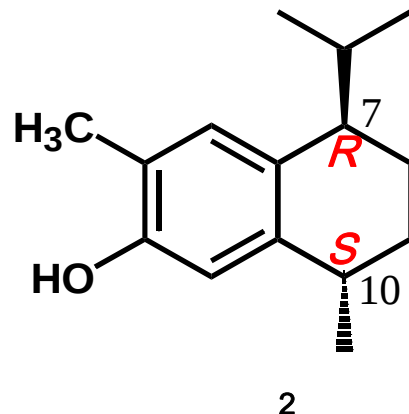
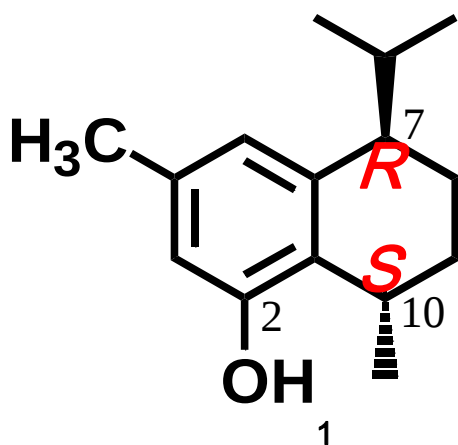
- donne une tache unique en CCM.
- EIMS m/z 220 (82 M^+)
- Mais les signaux en RMN ^{13}C montrent qu'on a un mélange (75/25) de cadinenal et de son épimère en C-6. Ils n'ont pas pu être séparés, donc leurs configurations absolues non déterminées



14 $R = \beta\text{H}$

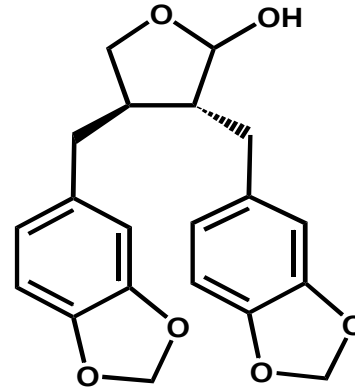
15 $R = \alpha\text{H}$

Sesquiterpènes de *Tarenna madagascariensis* (Rubiaceae)

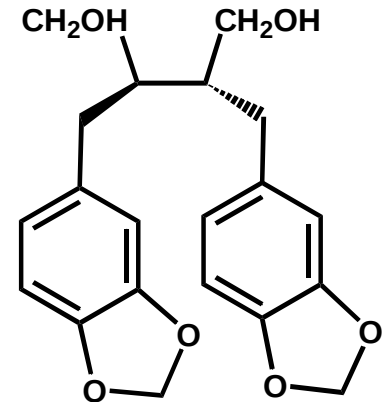


Autres constituants: 3 dimères dérivés du phénylpropane

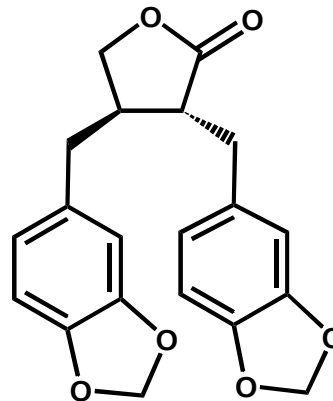
18 (-) Cubebin



19 (-) Dihydrocubebin



20 (-) Hinokinin



Tests biologiques

Les extraits au dichlorométhane et au méthanol ainsi que chaque produit isolé sont testés pour leur activité anti tumorale au niveau de la croissance globale de six lignées tumorales humaines.

Le test utilisé dénommé MTT est une technique indirecte permettant de mesurer en 5 jours l'effet d'un produit sur la croissance globale d'une population cellulaire se développant *in vitro*.

Ce test est basé sur la mesure de cellules vivantes, donc métaboliquement actives, au 5ème jour de culture, capables de transformer par réduction mitochondriale le produit MTT(3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényl tétrazolium bromide) de couleur jaunâtre en un produit de couleur bleue, le formazan.

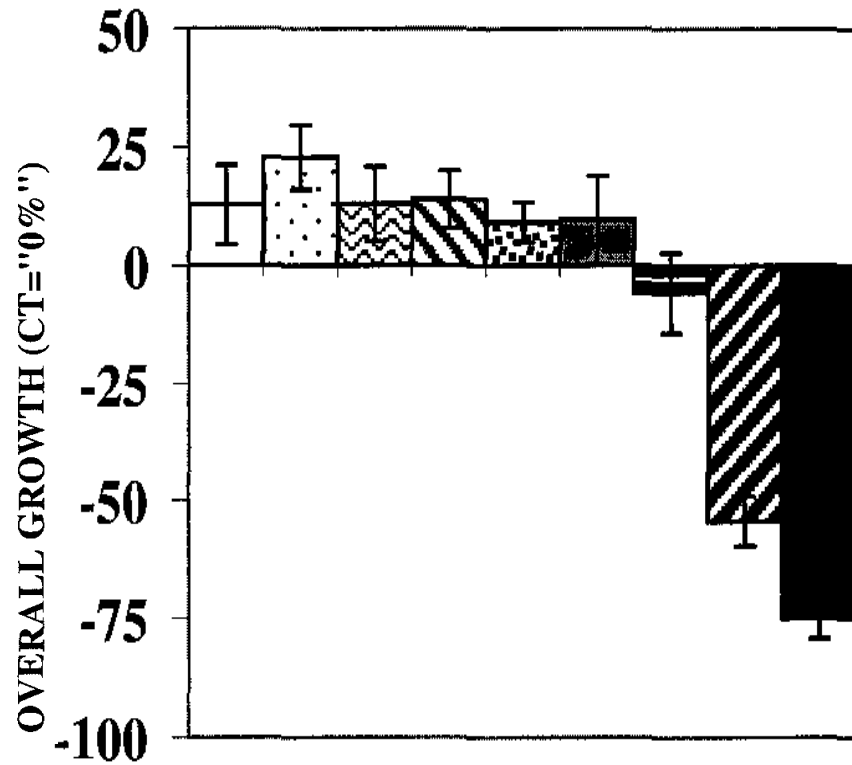
La quantité de formazan obtenue est mesurée par spectrophotométrie et est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. La mesure de la densité optique (DO) permet ainsi une mesure quantitative de l'effet du produit étudié au niveau de la croissance globale des populations cellulaires analysées et de le comparer à d'autres.

Six lignées tumorales humaines provenant de American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)

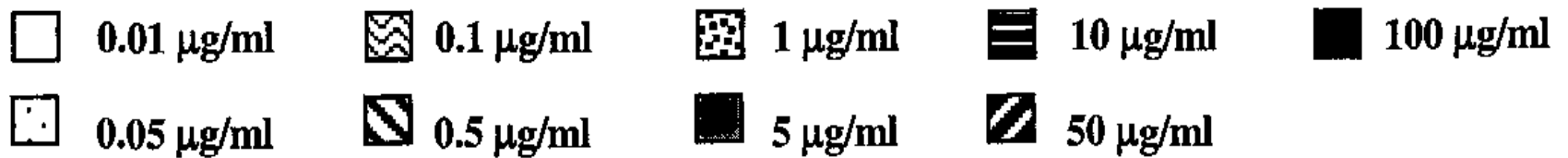
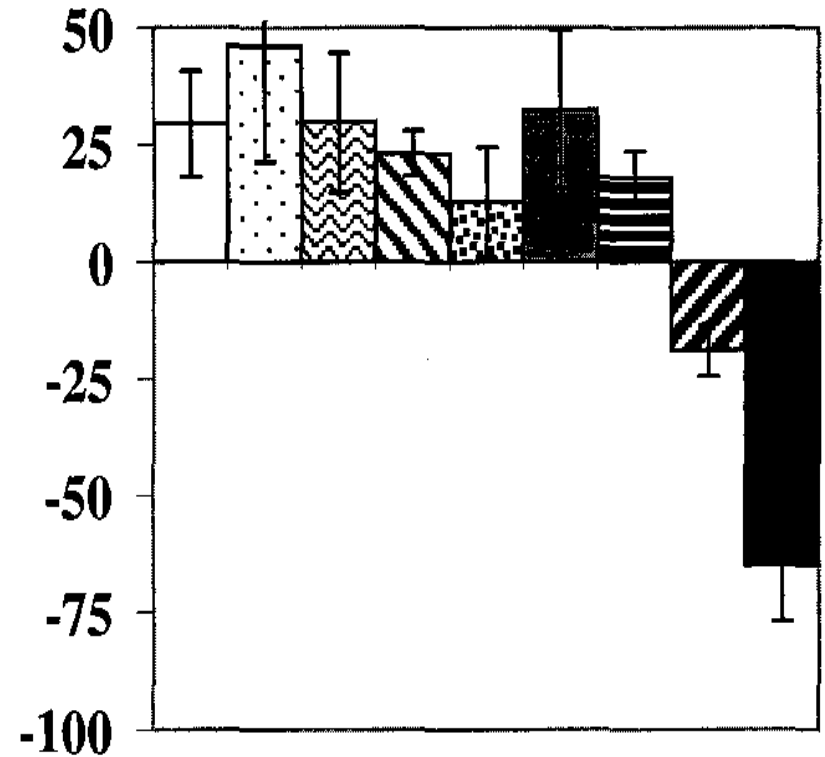
• U-373 MG	}	d'origine astrocytaire
• Hs683		
• HCT-15	}	d'origine colorectale
• LoVo		
• A549		d'origine pulmonaire
• MCF-7		d'origine mammaire

- Chaque extrait est analysé selon 9 concentrations allant de 10^{-5}M à 10^{-9}M
- Les résultats sont exprimés sous forme de graphique représentant la croissance globale des 6 lignées humaines tumorales en fonction du contrôle normalisé à 0%.
- L'IC₅₀ est la concentration qui inhibe la croissance cellulaire globale de 50%

28-ED-LCO-SM/03



28-EM-LCO-SM/03



Profil d'activité des extraits

- L'extrait au dichlorométhane réduit de manière statistiquement significative la croissance cellulaire globale aux concentrations de 100 à 0.5µg/ml.
- La valeur de l'IC₅₀ se situe entre 5 et 1µg/ml

- L'activité cytotoxique de l'extrait au méthanol est plus faible que celle obtenue avec l'extrait dichlorométhane.
- La valeur de l'IC₅₀ comprise entre 50 et 100µg/ml.

- Ces profils d'activité expliquent la poursuite de l'étude de l'extrait au dichlorométhane
- L'activité cytotoxique de chaque produit pur isolé a été testée.

Aucun des produits purs isolés ne présente d'activité antitumorale *in vitro* sur les lignées de cellules cancéreuses.

Les produits isolés ne sont donc pas responsables de l'activité cytotoxique modérée de l'extrait au dichlorométhane sur les six lignées de cellules cancéreuses humaines.

4. CONCLUSION

- L'étude phytochimique réalisée sur *Tarenna madagascariensis* a permis de mettre en évidence au total 10 sesquiterpènes dérivés du calamenene dont 5 nouveaux. Leurs configurations absolues et relatives ont été précisées.
- L'étude biologique a mis en évidence l'activité antitumorale modérée de l'extrait au dichlorométhane sur des lignées de cellules cancéreuses humaines.
- La suite des travaux consiste à rechercher les autres constituants responsables de cette activité cytotoxique modérée de l'extrait au dichlorométhane.



New calamenene sesquiterpenes from *Tarenna madagascariensis*

M. SALMOUN†, J. C. BRAEKMAN*†, Y. RANARIVELO‡,
R. RASAMOELISENDRA‡, D. RALAMBOMANANA‡, J. DEWELLE§,
F. DARRO§ and R. KISS¶

†Service de Chimie Organique (CP 160/06), Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles, 50 Avenue F.D. Roosevelt, 1050 Bruxelles, Belgique

‡Faculté des Sciences, Département de Chimie Organique, Laboratoire de Chimie Organique des Substances Marines, Université d'Antananarivo, Antananarivo BP 906, Madagascar

§Unibioscreen SA, 40 Avenue Joseph Wybran, 1070 Bruxelles, Belgique

¶Laboratoire de Toxicologie (CP 205/01), Institut de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, 50 Avenue F.D. Roosevelt, 1050 Bruxelles, Belgique

Je vous remercie de votre
attention