



LISSOCLINOTOXINS, ANTIBIOTIC 1,2,3-TRITHIANE DERIVATIVES : STRUCTURE AND SYNTHESIS.

Michèle GUYOT, M. LITAUDON, F. FRAPPIER, F. TRIGALO, M.T. MARTIN
and F. MONNIOT.

Laboratoire de Chimie, URA 401 C.N.R.S., 63 rue Buffon, 75231 PARIS Cedex 05, FRANCE.

Résumé : les lissoclinotoxines A et B ont été isolées d'un tunicier : *Lissoclinum perforatum*. Les structures ont été déterminées par les méthodes spectrales et des transformations chimiques. la synthèse du dérivé tétraacétylé de l'isomère de la lissoclinotoxine a pu être réalisée.

Abstract : lissoclinotoxines A and B have been isolated from the tunicate *Lissoclinum perforatum*. structural analysis were performed using spectral methods and chemical transformations. Synthesis led to the tetraacetylated derivative of *Lissoclinotoxine A*.

Lissoclinum perforatum est une ascidie coloniale (famille des didemnidées). et a été récoltée sur le littoral de la Bretagne nord ou de la Corse.

Les tuniciers sont riches en substances originales et biologiquement actives, et tout particulièrement les didemnidées ont fourni de nombreux produits cytotoxiques ou antitumoraux parmi lesquels nous citerons les didemnines (1), cyclodepsipeptides antitumoraux, les patellamides (2), les bistramines (3), la varamine (4), qui présentent des activités cytotoxiques.

L'extrait méthanolique présentait une forte activité antimicrobienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et une forte activité cytotoxique vis-à-vis de la tumeur expérimentale L 1210. Le fractionnement, suivi par le test antibactérien a montré que l'activité était due à deux produits principaux que nous avons appelé lissoclinotoxine-A et -B. Ce sont des produits polaires (élués par le mélange chloroforme méthanol 8/2).

Lissoclinotoxine A: c'est un solide de masse moléculaire M^+ 261, de formule brute $C_9H_{11}NO_2S_3$ (SMHR); les fragments les plus remarquables sont dus à la perte successive de deux molécules de soufre. Le spectre UV, (λ_{max} 215 et 246 nm) suggère la présence d'un noyau aromatique. Le spectre de 1H NMR montre un proton aromatique, un méthoxyle et deux méthylènes déblindés couplés entre eux.

Les difficultés de purification rencontrées en raison de l'instabilité du composé et de sa faible solubilité, nous ont conduit à préparer des dérivés permettant de caractériser les groupements fonctionnels de la molécule.

Une acétylation réalisée par le mélange pyridine/anhydride acétique conduit à un diacétate **1b** ($C_{13}H_{15}NO_4S_3$) comme produit majoritaire (30%).

Le spectre 1H RMN ($CDCl_3$) révèle la présence d'un proton aromatique, d'un proton résonant à 5,67 ppm (triplet), d'un méthoxyle à 3,83 ppm, de deux CH_2 couplés à δ 3,42 et 2,81 ppm (dt et t respectivement) et de deux acétates de déplacement chimique 2,34 et 1,96 ppm. Les couplages entre les signaux à 2,81 et 5,67 d'une part et les deux méthylènes montrent l'existence d'une chaîne $-CH_2 - CH_2 - NH$ Ac. La RMN du ^{13}C indique la présence de six carbones aromatiques.



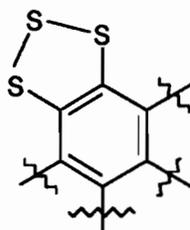
¹ H n.m.r. de la lissoclinotoxine A diacétate 1b (300 MHz, CDCl ₃)				¹³ C n.m.r. de la lissoclinotoxine diacétate 1b (75 MHz, CDCl ₃)			
¹ H n.m.r. de la lissoclinotoxine A diacétate 1b (300 MHz, CDCl ₃)				¹³ C n.m.r. de la lissoclinotoxine diacétate 1b (75 MHz, CDCl ₃)			
δ ppm	Integr.	Attribution		δ ppm	Attribution	δ ppm	Attribution
7.03	s	1H	H2	170.23 s	C-8'	127.54 d	C-2
5.67	t	1H	N-H	168.31 s	C-1'	62.60 q	C-6'
3.76	s	3H	CH ₃ -O	152.67 s	C-4	40.65 t	C-8
3.42	dt	2H	CH ₂ -8	145.74 s	C-1	35.86 t	C-7
2.81	t	2H	CH ₂ -7	142.55 s	C-2	23.18 q	C-8''
2.34	s	3H	OCOCH ₃	141.38 s	C-3	20.65 q	C-1''
1.96	s	3H	NHCOCH ₃	140.68 s	C-6		

Lorsque l'acétylation est réalisée dans le DMF par un mélange DMAP/anh. acét. plusieurs produits sont obtenus, le produit majoritaire étant un tétraacétate de formule moléculaire: C₁₇H₂₁NO₆S₂, confirmée par l'analyse élémentaire du soufre.

La RMN du ¹H de ce tétraacétate **2** révèle, outre les signaux précédemment mentionnés pour le diacétate, deux acétates supplémentaires correspondant à des thioacétates (2,37 et 2,34 ppm) résultats confirmés par la RMN du ¹³C (5): 193.5 et 192.5 (S-CO-CH₃); 30.17 et 30 00 (S-CO-CH₃)

L'ensemble de ces données nous permet de proposer une structure constituée d'un noyau aromatique pentasubstitué et dont les substituants sont : un méthoxyle, un hydroxyle, deux soufres et une chaîne - CH₂ - CH₂ - NH₂.

Compte tenu du fait que le dérivé tétraacétylé ne contient que deux soufres et le dérivé diacétylé 3 soufres et en raison des contraintes engendrées par la structure plane aromatique nous déduisons que la lissoclinotoxine A possède un pont trisulfure positionné sur deux carbones en *ortho* conformément à la structure ci-dessous.



La position des substituants sur le noyau aromatique restait à déterminer. Les règles d'incrémentation sur un tel noyau ne nous permettent pas de les positionner les uns par rapport aux autres avec certitude en raison du faible nombre de composés aromatiques soufrés décrits dans la littérature.

La mesure des effets NOE, a montré que le proton aromatique était en α de la chaîne alkyl, cependant en raison de la mobilité des groupements acétyles la position respectives des substituants OMe et OAc ne pouvait être fixée de façon absolue.

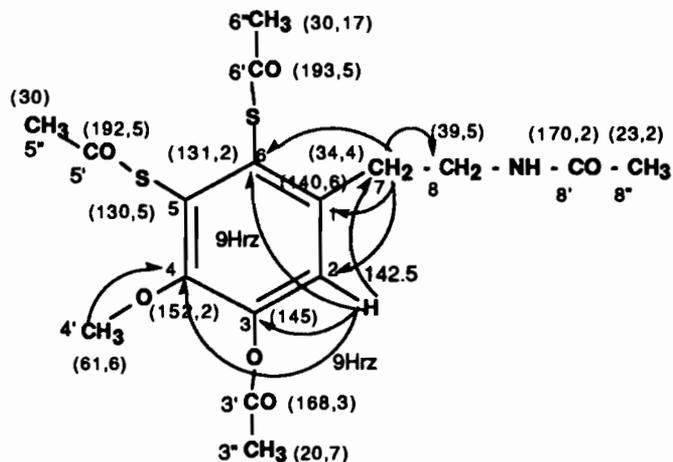
Nous avons donc effectué un spectre de corrélation carbone-proton longue distance, en mode inverse. Les corrélations observées sont les suivantes :

- le proton aromatique H2 a un grand couplage (160 Hz) avec le carbone le portant,
- une constante de couplage de 9 Hz (*meta*) avec les carbones à 152,2 ppm et 131,2 ppm qui sont donc en 4 et 6; le carbone 4 (152,2 ppm) étant corrélié avec les protons du méthoxyle,
- les protons du CH₂ en 7 et les carbones 4, 5, 6 et 8 (respectivement: 131,2; 140,6; 127,4 et 39,5 ppm).



Ces observations regroupées dans la figure suivante indiquent en particulier la position *meta* du groupement méthoxyle par rapport au proton aromatique.

Tétraacétate de la lissoclinotoxine A (corrélation carbone/proton longue distance)



Lissoclinotoxine B : le deuxième produit antibiotique isolé est un solide de formule brute $C_{10}H_{11}NO_2S_3$ (HRMS) et a été analysé sous forme du diacétate (anhydride acétique /pyridine).

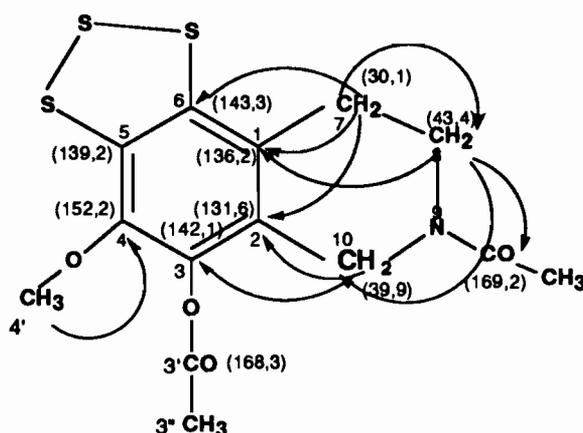
Le spectre de RMN 1H du diacétate diffère de celui de la lissoclinotoxine A par l'absence de proton aromatique et du proton correspondant à NH -Ac, et l'apparition d'un système AB constitué de deux protons présentant un déplacement chimique de 4,52 et 4,61 ppm et dont la constante de couplage est $J(gem)$ 17,4 Hz.

1H n.m.r. de la lissoclinotoxine B diacétate 3h (300 MHz, $CDCl_3$)				^{13}C n.m.r. de la lissoclinotoxine B diacétate 3h (75 MHz, $CDCl_3$)			
δ ppm		Attribution		δ ppm		Attribution	
4,61	d	1H (système AB,		169,3	s	O-CO-CH ₃	
4,52	d	1H J_{gem} : 17,4)	CH ₂ -10	168,1	s	-NR-CO-CH ₃	
3,86	s	3H	CH ₃ -O	152,2	s	C-4	
3,66	m	2H (5,8 Hz)	CH ₂ (8)	143,3	s	C-6	
3,21	dt	1H (J_{gem} : -17 Hz		142, 1	s	C-3	
3,06	dt	1H 5,8Hz	CH ₂ -7	139,9	s	C-5	
2,37	s	3H	CH ₃ -CO-O	136,2	s	C-1	
2,15	s	3H	CH ₃ -CO-N	131,6	s	C-6	
				62,7	q	O-CH ₃	
				39,9	t	CH ₂ 10	
				43,4	t	CH ₂ 8	
				30,1	t	CH ₂ 7	
				21,3	q	CH ₃ -CO-N	
				20,4	q	CH ₃ -CO-O	



Les déplacements chimiques des carbones du diacétate de la lissoclinotoxine B sont très proches de ceux du diacétate de la lissoclinotoxine A.

Le spectre de corrélation carbone-proton longue distance en mode inverse permet d'attribuer la structure suivante :



Activité biologique : les lissoclinotoxines sont de puissants agents antimicrobiens, d l'activité à tout d'abord été appréciée par la méthode des disques. Vis-à-vis de *S.aureus* les diam.d'inhibition sont respectivement de 35 et 30mm/disk/100 mg

Les CMI de la lissoclinotoxine A vis-à-vis de nombreux germes ont été évaluées et sont égales ou supérieures à celles du céfotaxime.

L'activité de la lissoclinotoxine A sur les souches de bactéries marines ichtyopathogènes est également fort intéressante, bien supérieure à celle de la pénicilline G.

Souches	Pénicilline G (6 mg)	Lissoclinotoxine A (30 mg)
<i>Aeromonas salmonicida</i> 643	0	40
<i>Vibrio anguillarum</i> 5536	12	35
<i>Vibrio anguillarum</i> 408	12	30

La lissoclinotoxine A est également active vis-à-vis de *Candida albicans* et *Trichosporo mentagrophytes* (CMI 40 et 20 µg/ml) respectivement et cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales L1210.

La cytotoxicité vis-à-vis de la leucémie P388 *in vitro* montre une ID 90 de 1 µg/ml.

L'activité antitumorale a été évaluée sur la leucémie P388 *in vivo* au centre de Rhône-Poulenc Santé: une T/C limite de 125% à une dose de 3,125 mg/kg avec une dose toxique de 12,5 mg/kg fait donc apparaître une trop faible activité antitumorale à la dose maximale tolérée.

La lissoclinotoxine A présente également une activité antimalarique comparable à la quinine et la chloroquine, mais inférieure à celle de la méfloquine ou l'halofantrine (souche résistante).

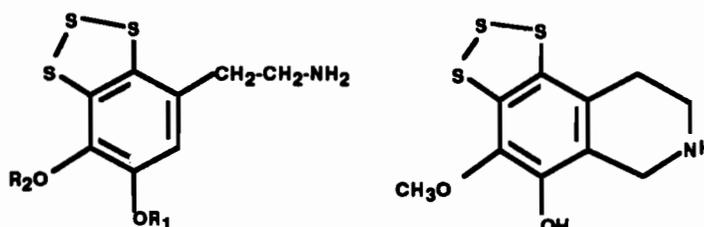
La lissoclinotoxine A présente des activités antibiotique, antifongique, cytotoxique et antimalarique très intéressantes, parfois comparables aux substances de référence connues. La toxicité pour les mammifères est cependant importante, bien qu'elle paraisse moindre pour les poissons.

Les lissoclinotoxines présentent une structure originale. Très peu de dérivés naturels



possédant un pont trisulfure ont été décrits dans la littérature. Il est intéressant de noter que parmi ceux-ci l'un d'entre eux isolé d'un tunicier possède également une activité antibiotique et antifongique (6).

Ceci nous a incité à entreprendre la synthèse des lissoclinotoxines A et B, ainsi que celle d'analogues dans le but d'accéder à des produits aussi actifs et moins toxiques.



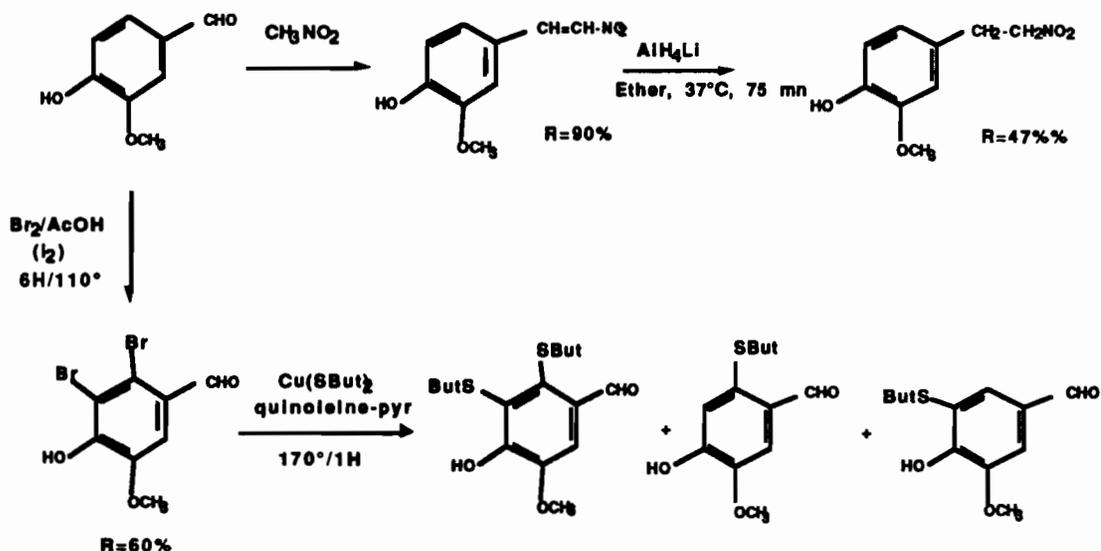
1a : R₁ = OMe, R₂ = OH

1b : R₁ = OH, R₂ = OMe

2

Synthèse : nous avons donc entrepris de réaliser tout d'abord la synthèse des deux isomères possibles **1a** et **1c**. Pour la synthèse de **1a** nous avons choisi de partir de la vanilline comme matière première en raison de son prix abordable. La synthèse de l'isomère **1c** pouvant être réalisée à partir de l'isovanilline.

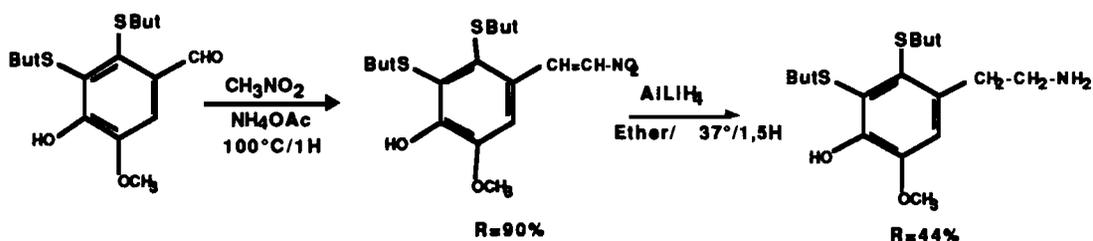
Les premiers travaux ont donc consisté à mettre au point d'une part l'obtention de la o-méthyl dopamine à partir de la vanilline selon (7) qui a été réalisée avec un rendement satisfaisant, d'autre part la formation des dérivés dibromés à partir de la vanilline et de l'isovanilline.



Parallèlement la bromation de la vanilline a été effectuée selon (8). La proportion de brome induisant les meilleurs rendements est importante (8 à 15 fois la quantité théorique). Cependant si la bromation de la vanilline se fait avec un bon rendement, la bromation de l'isovanilline ne conduit qu'à un faible rendement en dérivé dibromé, et en attendant de trouver un moyen de contourner cette difficulté, nous avons poursuivi la synthèse de l'isomère **1a**.

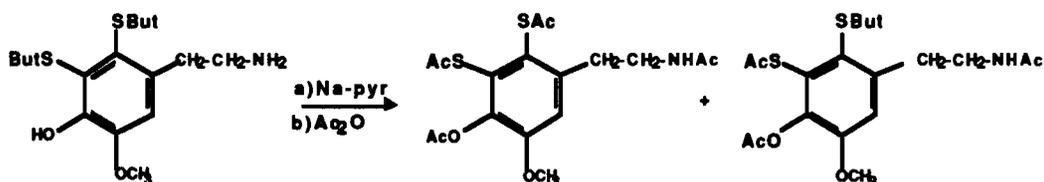
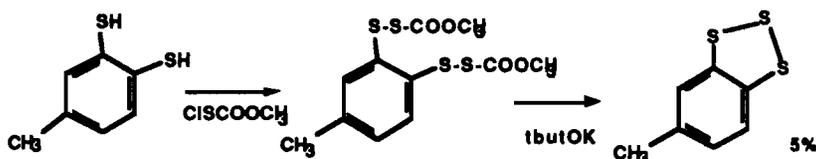
L'introduction des groupements S-butyl par l'intermédiaire du cuprate (9) conduit au produit disubstitué majoritaire (60%) et aux deux produits de monosubstitution.

La séquence de réaction a été poursuivie en introduisant tout d'abord les groupements S-alkyl avant d'introduire la chaîne CH₂-CH₂-NH₂.

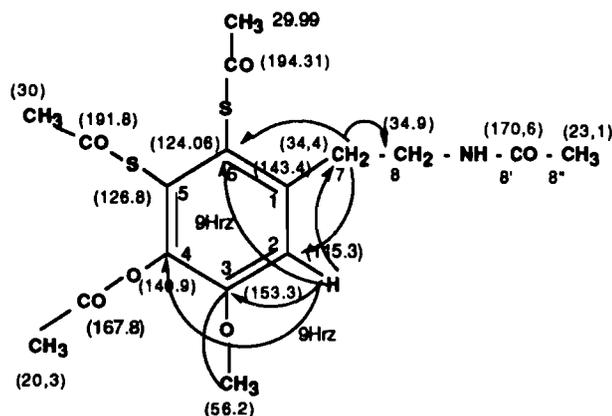


Par déalkylation du dérivé di-S-butyl, nous pouvions accéder à l'isomère 1a par la formation du pont trisulfure. Des essais sur un modèle: le toluène dithiol n'ont jusqu'à présent permis d'obtenir le trithiane qu'avec un rendement de 5 % en utilisant la technique de Milligan (10).

Nous avons donc tenté d'accéder au dérivé tétraacétylé, puisque nous avons le produit de référence, par une déalkylation, suivie d'une acétylation. De nombreuses méthodes de déalkylation d'alkyl-thioethers sont décrites, la plupart ne donnent que des dialkylations partielles. Nous avons choisi d'utiliser le sodium en présence de pyridine puis de traiter par l'anhydride acétique selon (11). A ce stade le rendement est nettement faible (14%) et doit être amélioré.



Le spectre corrélé carbone-proton longue distance en mode inverse permet de confirmer la structure du produit de synthèse, isomère de la lissoclinotoxine A.





Si la synthèse des lissoclinotoxines n'est pas évidente du point de vue des rendements, il faut noter que les intermédiaires de synthèse présentent une activité antibactérienne dès l'introduction des groupements thioalkyls. Nous espérons donc obtenir au cours de ces synthèses un ou plusieurs produits biologiquement actifs, plus aisés d'accès que les lissoclinotoxines elles-mêmes.

Un autre intérêt de ce travail réside dans l'étude R.M.N. En effet il existe peu de références dans la littérature concernant les dérivés aromatiques soufrés. Ce travail doit permettre de dégager des données utiles pour l'analyse structurale des composés dans cette série

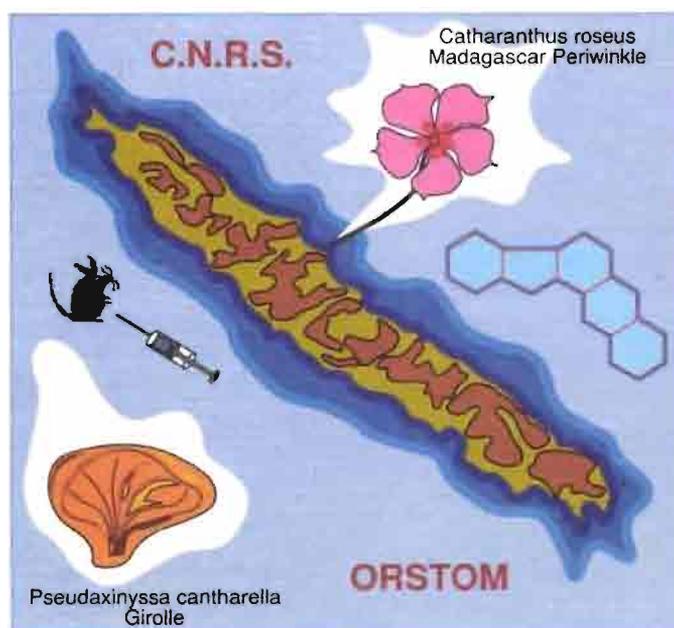
Bibliographie

1. Rinehart K.L. Jr, Gloer J.B., Cook J.C., Mizesak S.A. et Scahill T.A., *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1857 (1981) ; Rinehart K.L. Jr, Gloer J.B., Hughes R.G. Jr, Renis H.F., Mc Govien J.P., Swynenberg E.B., Stringfellow D.A., Kuentzel S.A. et Li L.H., *Science* **212**, 933 (1981)
2. Ireland C.M. et Scheuer P.J., *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5688 (1980); Degnan B.M., Hawkins C., Lavin M.F., Mc Caffrey E.J., Parry D.L., Van den Brenk A.L. et Watters D.J., *J. Med. Chem.* **32**, 1349 (1989)
3. Degnan B.M., Hawkins C.L., Lavin M.F., Mc Caffrey E.J., Parry D.L. et Watters D.J., *J. Med. Chem.* **32**, 1354 (1989)
4. Molinski T.F. et Ireland C.M., *J. Org. Chem.* **54**, 4255 (1989)
5. Middaugh R.L. et Drago R.S., *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2575 (1963)
6. Copp B.R., Blunt J.W., Munro M.H.G. et Panell L.W.K., *Tetrahedron Lett.* **30**, 3703 (1989)
7. Sekine Y., Creveling C., Bell M. et Brossi A., *Helv. Chim. acta* **73**, 426 (1990)
8. Raiford L.C. et Hilman G.C., *J. Am. Chem. Soc.* **49**, 1571 (1927)
9. Adams, Reifschweider W. et Terreti A., *Org. Synth.* **42**, 22 (1962)
10. Milligan B. et Swan J.M., *J. Chem. Soc.*, 2901 (1965)
11. Wellman D.E. et Wual F., *J. Org. Chem.* **50**, 2335 (1985)

Troisième Symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie

Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 26-30 Août 1991

ACTES



Editeurs : Cécile DEBITUS, Philippe AMADE,
Dominique LAURENT, Jean-Pierre COSSON