

La girolline, nouvelle substance antitumorale extraite de l'Éponge, *Pseudaxinyssa cantharella* n. sp. (Axinellidae)

Alain AHOND, Manuel BEDOYA ZURITA, Michel COLIN, Christian FIZAMES,
Pierre LABOUTE, François LAVELLE, Dominique LAURENT, Christiane POUPAT,
Jacques PUSSET, Michelle PUSSET, Odile THOISON et Pierre POTIER

Résumé — Une nouvelle substance antitumorale a été isolée d'une Éponge néo-calédonienne, *Pseudaxinyssa cantharella*. Sa structure a été établie à l'aide de ses caractéristiques spectrales et par préparation de dérivés sélectivement substitués.

Girolline, a new antitumoral compound extracted from the Sponge, *Pseudaxinyssa cantharella* n. sp. (Axinellidae)

Abstract — The Sponge, *Pseudaxinyssa cantharella*, collected in New Caledonia, had earlier been shown to contain sterols and various pyrrole and imidazole metabolites. From the crude ethanolic extract, a anti-tumoral substance has now been isolated, named girolline, to which structure 1 has been assigned.

Girolline, $C_6H_{11}ClN_4O$, is present in the organism as a hygroscopic hydrochloride, but forms a crystalline bis-camphosulfonate. Its structure is essentially deduced from the 1H , ^{13}C and ^{15}N -NMR spectra; it is confirmed by the preparation of several derivatives: girolline reacts with adamantyl fluoroformate to give a mixture of "di- and tri-adamantyl" derivatives, the first of which provides, upon treatment with acetic anhydride and pyridine, an *O*-acetyl and an *N,O*-diacetyl derivatives. Similar results have been obtained by treatment of girolline with 2,4-dinitro-fluorobenzene, which gives a bis-(dinitrophenyl) derivative, acetylated to its *O*-acetate.

The girolline is active on P388 leukaemia in vitro and in vivo.

L'étude d'une nouvelle Éponge néo-calédonienne, décrite récemment par C. Lévi sous le nom de *Pseudaxinyssa cantharella* [1], a déjà conduit à identifier plusieurs stérols [2] ainsi que divers métabolites pyrroliques et imidazoliques [3]. Aucune de ces substances ne présente d'activité cytotoxique, alors qu'une telle activité a pu être décelée sur l'extrait brut.

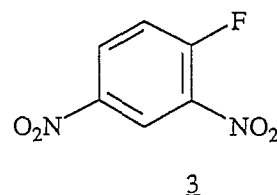
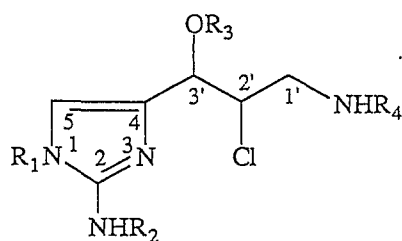
La poursuite du fractionnement de l'extrait brut, contrôlé à chaque étape par un test d'activité et par une analyse en RMN [4], a conduit à l'isolement d'un dérivé nouveau de l'amino-2 imidazole que nous avons appelé girolline et qui répond à la formule 1 [5].

L'Éponge, congelée dès sa récolte, a été broyée et lyophilisée. Son extrait alcoolique est chromatographié sur silice et filtré sur « Sephadex LH 20 » : on obtient ainsi une poudre blanche, $[\alpha]_D^{20} + 7,9^\circ$ (méthanol, $c=0,84$); pK_A 6,6 et 8,3], très hygroscopique (0,5 g/kg d'Éponge congelée), dont l'analyse montre qu'il s'agit d'un chlorhydrate. Celui-ci n'a pas été obtenu sous forme analytiquement pure mais la base libre a donné avec l'acide D-camphosulfonique un sel cristallisé 2, $F=212^\circ C$, $[\alpha]_D^{20} + 34^\circ$ (méthanol, $c=0,6$) dont la composition centésimale [6] montre qu'il s'agit du bis-camphosulfonate d'un produit $C_6H_{11}ClN_4O$.

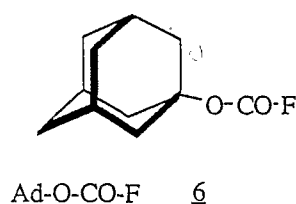
La structure de la girolline a été établie essentiellement par l'étude des données spectrales de résonance magnétique nucléaire (RMN) (tableau) et de masse :

— L'étude du spectre de RMN du proton et celle des découplages 1H - 1H en mode normal et par différence [4], celle des spectres de RMN du carbone-13 (spectre de bruit, spectre avec découplage partiel, spectre sans découplage et intégration des carbones) [7] ainsi que celle du spectre de corrélation 1H - ^{13}C et enfin celle du spectre de l'azote-15 (en

Note présentée par Guy OURISSON.



- 1 $R_1=R_2=R_3=R_4=H$, 2 HCl
 2 $R_1=R_2=R_3=R_4=H$, 2 $HSO_3C_{10}H_{15}O$
 4 $R_1=R_3=H$, $R_2=R_4=Ph(NO_2)_2$
 5 $R_1=R_3=Ac$, $R_2=R_4=Ph(NO_2)_2$
 7 $R_1=R_3=H$, $R_2=R_4=AdO-CO$
 8 $R_1=H$, $R_2=R_3=R_4=AdO-CO$
 9 $R_1=H$, $R_2=R_4=AdO-CO$, $R_3=Ac$
 10 $R_1=R_3=Ac$, $R_2=R_4=AdO-CO$



découplage total) [7] ont conduit à proposer une structure d'amino-2 imidazole substitué en position 4 par une chaîne amino-1' chloro-2' hydroxy-3' propyle. La position du chlore a été fixée en 2' au vu de la constante de couplage $J_{C2'-H} = 154$ Hz [8], bien différente de $J_{C1'-H}$ et $J_{C3'-H} = 147$ et 146 Hz.

— L'étude du spectre de masse en bombardement atomique rapide montre un pic à MH^+ 191 et un pic dimère $(2M+H)^+$ à 381. Celle du spectre de masse en désorption-ionisation chimique, avec l'ammoniac NH_3 comme gaz vecteur, montre un double pic à MH^+ 191, 193 d'intensités caractéristiques des isotopes d'un chlore. Le même spectre, avec ND_3 comme gaz vecteur, permet l'observation d'un pic principal à MD^+ 198 qui confirme la présence de six protons échangeables dans la molécule (2 NH_2 , 1 NH et 1 OH) [9].

La girolline comporte plusieurs fonctions acylables : elles ont été fonctionnalisées sélectivement par des réactifs spécifiques. Le dinitro-2,4-fluorobenzène 3 réagit sur la girolline-base en donnant un dérivé bis-(dinitrophénylé) 4 qui est N,O-diacétylé par l'anhydride acétique dans la pyridine en dérivé 5 [10]. La girolline (15 mg, 0,08 mmole) en solution aqueuse bicarbonatée (pH 8-9) est traitée par le fluorocarbonate d'adamantyle 6 (47,6 mg, 0,24 mmole) ajouté en trois fois en solution dans le dioxanne. Après 6 h à température ambiante, on obtient, après extraction par l'éther puis chromatographie sur couche épaisse de silice, deux produits : un dérivé « diadamantylé » 7 (9 mg) et un dérivé « triadamantylé » 8 (7,3 mg) [11]. Le premier, 7, traité par l'anhydride acétique et la pyridine, fournit deux produits : un dérivé mono-O acétylé 9 et un dérivé di-N,O-acétylé 10 [12]. Tous ces produits, dont aucun n'a pu être cristallisé, donnent par bombardement atomique rapide (FAB) ou par ionisation chimique (pour 9 et 10) des spectres de masse compatibles avec les formules indiquées [9]. Notons que l'acétylation de l'hydroxyle se traduit, dans tous les cas, par un déplacement du signal attribué au proton en 3' d'un $\Delta\delta$ d'environ $1,1$ à $1,35 \cdot 10^{-6}$ en RMN.

Tout ceci nous permet de confirmer pour la chaîne propyle les positions d'une amine en 1', du chlore en 2' et de l'hydroxyle en 3'.

TABLEAU

	$\delta^{13}\text{C}$ (10^{-6})	Multi- plicité	J(Hz)	$\delta^1\text{H}$ (10^{-6})	Multi- plicité	J(Hz)	$\delta^{15}\text{N}$ (10^{-6})
1	-	-	-	-	-	-	151,3
2	148,03	d ép.	7	-	-	-	-
2a	-	-	-	-	-	-	71,4
3	-	-	-	-	-	-	151,3
4	126,25	d ép.	6	-	-	-	-
5	113,25	d	202	6,80	d	1	-
1'	44,4	t	147	3,48	dd	13,7 et 9,4	-
				3,64	dd	13,7 et 3,3	-
1'a	-	-	-	-	-	-	47,6
2'	61,2	dd	154 et 4	4,62	dt	9,4 et 3,3	-
3'	67,3	d	146	5,19	dd	3,3 et 1	-

RMN ^{13}C à 100,1 MHz, D_2O avec dioxanne et TMS comme référence externe.

RMN ^1H à 400 MHz, D_2O (à 4,83).

RMN ^{15}N à 40 MHz, D_2O avec NH_4Cl comme référence externe.

La girolline s'est montrée active *in vitro* sur les cellules leucémiques P 388 à des concentrations de 0,001 à 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; cette activité a été confirmée *in vivo* chez la Souris greffée avec des cellules leucémiques P 388 à des doses voisines de 1 mg/kg par voie intrapéritonéale.

Note reçue le 18 avril 1988, acceptée le 22 avril 1988.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. LÉVI, *Bull. Mus. natn. Hist. nat.*, Paris, 4^e série, 5, 1983, p. 719-722.
- [2] G. DE NANTEUIL, A. AHOND, C. POUPAT, P. POTIER, M. PUSSET, J. PUSSET et P. LABOUTE, *Tetrahedron*, 41, 1985, p. 6035-6039.
- [3] G. DE NANTEUIL, A. AHOND, J. GUILHEM, C. POUPAT, E. TRAN HUU DAU, P. POTIER, M. PUSSET, J. PUSSET et P. LABOUTE, *Tetrahedron*, 41, 1985, p. 6019-6033.
- [4] Spectres enregistrés sur l'appareil expérimental 400 MHz I.E.F. Orsay, aimablement mis à notre disposition par MM. S.-K. Kan et M. J. Sauzade.
- [5] Brevet Rhône-Poulenc Santé, FR 2.585.020, 18 juillet 1985.
- [6] $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{ClN}_4\text{O}_9\text{S}_2$; Microanalyse : C : 47,5; H, 6,4; Cl : 5,6; N : 8,7; O : 21,8; S : 9,6 (Calc C : 47,6; H : 6,5; Cl : 5,4; N : 8,5; O : 20,0; S : 9,7).
- [7] Les spectres de RMN de ^{13}C et de ^{15}N ont été aimablement enregistrés sur spectromètres « Brüker WP et WM 400 » par M^{me} C. Fontaine et MM. J.-C. Beloeil et E. Guittet.
- [8] W. H. GERWICK, *Phytochemistry*, 23, 1984, p. 1323-1324.
- [9] Les spectres de masse ont été aimablement enregistrés sur appareils « A.E.I. MS9 » et « Kratos MS 50 » par M. P. Varenne (I.C.S.N.) et M. M. Vuilhorgne (R.P.S.).
- [10] Dérivé bis-(dinitro-2,4 phénylé) 4 : $R_f=0,23$ dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 8/2; $[\alpha]_D^{20}$ (MeOH); S.M. FAB : 523, 525; RMN ^1H (400 MHz, CD_4O) $\delta \cdot 10^{-6}$: 3,86 (dd, J=15 et 7 Hz, 1H, $\text{C}_{1'}$ -H), 4,0 (dd, J=15 et 5 Hz, 1H, C_1 -H), 4,55 (m, 1H, C_2 -H), 4,80 (d, J=5 Hz, 1H, C_3 -H), 6,83 (s, 1H, C_5 -H), 7,23 (d, J=9 Hz, 1H, $\text{C}_{6''}$ -H), 7,97 (d, J=9 Hz, 1H, $\text{C}_{6''}$ -H), 8,35 (dd, J=9 et 3 Hz, 1H, $\text{C}_{5''}$ -H), 8,70 (dd, J=9 et 2,5 Hz, 1H, $\text{C}_{5''}$ -H), 8,98 (d, J=3 Hz, 1H, $\text{C}_{3''}$ -H), 9,08 (d, J=2,5 Hz, 1H, $\text{C}_{3''}$ -H). Dérivé bis-(dinitro-2,4 phénylé) N,O-diacétylé 5 : $R_f=0,60$; IR (CHCl_3) : 3 350, 1 735, 1 710, 1 610 cm^{-1} ; RMN ^1H (200 MHz, CD_4O) $\delta \cdot 10^{-6}$: 1,9 et 2,16 (2s, 2x3H, 2 COCH_3), 3,9 [m, 2H, $\text{C}_{1'}$ -H(2)], 4,8 (m, 1H, C_2 -H), 6,14 (d, J=7,5 Hz, 1H, C_3 -H), 7,2 (d, J=9,5 Hz, 1H, $\text{C}_{6''}$ -H), 7,56 (s, 1H, C_5 -H), 7,95 (d, J=9 Hz, 1H, $\text{C}_{6''}$ -H), 8,37 (dd, J=9,5 et 2,5 Hz, 1H, $\text{C}_{5''}$ -H), 8,73 (dd, J=9 et 2,5 Hz, 1H, $\text{C}_{5''}$ -H), 9,03 (d, J=2,5 Hz, 1H, $\text{C}_{3''}$ -H), 9,12 (d, J=2,5 Hz, 1H, $\text{C}_{3''}$ -H).
- [11] Dérivé « diadamantylé » 7 : $R_f=0,27$ dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$: 1/1; S.M. FAB : 547, 549; RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) $\delta \cdot 10^{-6}$: 1,67 et 2,18 (2 m, 15H de l'adamantyle), 3,4 et 3,73 [2 m, 2H, $\text{C}_{1'}$ -H(2)], 4,37

(m, 1 H, C₂'-H), 4,77 (d, J=2 Hz, 1 H, C₃'-H), 6,96 (s, 1 H, C₅-H), 4,46, 5,5 et 5,9 (3 m, NH et OH).
Dérivé « triadamantylé » 8 : R_f=0,81; [α]_D+12,6° (CHCl₃, c=3,1) S.M. FAB : 725, 727; RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) δ. 10⁻⁶ : 1,7 et 2,25 (2 m, 15 H de l'adamantyle), 3,48 [m, 2 H, C₁'-H(2)], 4,47 (m, 1 H, C₂'-H), 5,67 (d, J=6 Hz, 1 H, C₃'-H), 6,96 (s, 1 H, C₅-H), 5,30 (m, 1 H, NH), 5,87 (m, 2 H, NH).

[12] Dérivé mono-O-acétylé 9 : R_f=0,60 dans CH₂Cl₂/AcOEt : 1/1; SMIC : 589, 591; RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, δ. 10⁻⁶) : 1,6 et 2,17 (2 m, 15 H de l'adamantyle), 2,25 (s, 3 H, COCH₃), 3,43 [m, 2 H, C₁'-H(2)], 4,47 (m, 1 H, C₂'-H), 5,85 (d, J=6 Hz, 1 H, C₃'-H), 6,92 (s, 1 H, C₅-H), 5,15 et 5,77 (2 m, NH). Dérivé di-N,O-acétylé 10 : R_f=0,63; SMIC : 631, 633; RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) δ. 10⁻⁶ : 1,65 et 2,18 (2 m, 15 H de l'adamantyle), 2,28 et 2,47 (2 s, 6 H, 2 × COCH₃), 3,5 [m, 2 H, C₁'-H(2)], 4,55 (d ép., J=6 Hz, 1 H, C₂'-H), 6,0 (d, J=6 Hz, 1 H, C₃'-H), 7,10 (s, 1 H, C₅-H), 5,20 et 9,65 (2 m, NH).

A. A., M. BZ., C. P., O. T. et P. P. : Institut de Chimie des Substances naturelles du C.N.R.S.,
91198 Gif-sur-Yvette Cedex;

M. C., C. F. et F. L. : Rhône-Poulenc Santé, 13, quai Jules-Guesde, 94400 Vitry;

P. L. et D. L. : Centre O.R.S.T.O.M., B.P. n° A5, Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie;

M. P. et J. P. : Laboratoire des Plantes médicinales du C.N.R.S., B.P. n° 643, Nouméa, Nouvelle-Calédonie,
adresse actuelle : I.C.S.N., 91190 Gif-sur-Yvette.