

ALCALOIDES D'UNE ASCIDIE NEOCALEDONIENNE, *EUDISTOMA FRAGUM*.

Cécile Debitus, Dominique Laurent,

Centre ORSTOM, BP A5, *Nouméa, Nouvelle Calédonie*

et Mary Païs,

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91198 *Gif sur Yvette, France*

11 MAI 1989

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 26.378-ep 1 M

Cote : B

VII p129

Abstract: Two alkaloids, 5-bromo N,N-dimethyltryptamine **1** and a new N-methyl 1,2,3,4-tetrahydro β -carboline, woodinine **2**, have been isolated from the New-Caledonian tunicate *Eudistoma fragum*. Structure elucidation was accomplished by spectroanalytical methods.

L'ascidie *Eudistoma fragum* F. Monniot (Polycitoridae) étudiée ici est une nouvelle espèce originale du lagon néo-calédonien (1). Elle a été récoltée dans le Canal Woodin, qui sépare l'île Ouen de la Grande Terre, où elle est abondante aux environs de 30 mètres de profondeur.

L'organisme lyophilisé est extrait par EtOH. La solution alcoolique est concentrée et extraite à son tour par CH_2Cl_2 . L'extrait chlorométhylénique ainsi obtenu présente une forte activité antibiotique sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. L'ascidie a été récoltée à plusieurs reprises et l'activité antibiotique est à chaque fois retrouvée motivant ainsi l'étude chimique de cet organisme.

L'analyse autobiographique sur les deux souches de microorganismes indique que l'activité se situe au niveau de produits qui se révèlent facilement par le réactif de Dragendorff. Ces alcaloïdes sont alors séparés des produits neutres par échange acide-base et purifiés sur plaques préparatives de silice. Deux produits sont ainsi obtenus.

L'alcaloïde majoritaire **1**, de masse 266,0439 (hreims), répond à la formule brute $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2^{79}\text{Br}$. Son spectre ultraviolet (λ_{max} (nm), 227, 290, 300ép.) est caractéristique d'un squelette indolique substitué en 5 (2). Par ailleurs, les spectres de rmn du ^1H et de masse (m/z 58; 100%) montrent la présence d'une chaîne diméthylaminoéthyle et l'analyse détaillée du spectre de rmn du ^1H en différents solvants (CDCl_3 et $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) permet d'identifier cet alcaloïde à la bromo-5 N,N-diméthylaminoéthyltryptamine **1**, isolée d'une éponge du genre *Smenospongia* (3,5,6). Le spectre de rmn du ^{13}C est en accord avec cette structure (3).

L'alcaloïde minoritaire **2** est nouveau et a été dénommé woodinine. De masse 348,08297 (hreims), il répond à la formule brute $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_3^{79}\text{Br}$. Le spectre ultraviolet (2,7) ainsi que l'observation des effets de solvants sur les protons aromatiques (6) permettent de penser qu'il possède un chromophore indolique de même substitution que l'alcaloïde **1**. Un signal à 2,53ppm (s, CDCl_3) sur le spectre de rmn du ^1H attribuable à 2 N-méthyles et l'absence du proton 2 du noyau indolique dans la zone du système des protons aromatiques du cycle A laissent supposer que le squelette de cette molécule est une N-méthyltétrahydro-1,2,3,4 β -carboline. Le spectre de masse indique que cette tétrahydro β -carboline doit être substituée le plus probablement en 1 par un groupement de masse 84 **3** ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}$, 100%), dont la perte fournit le fragment **4**, (m/z 263,01762, $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2^{79}\text{Br}$, 4%) (schéma 1). Cette hypothèse est appuyée par la présence sur le spectre de rmn du ^1H d'un singulet élargi à 3,60ppm attribué au proton en 1. Ces éléments permettent de rapprocher la woodinine de l'eudistomine H, isolée d'une ascidie du même genre, *Eudistoma olivaceum* (8,9), dont elle serait le dérivé de N,N-diméthylation et d'hydrogénation naturel, et de proposer la structure **2** pour cet alcaloïde. Cette structure est confirmée, d'une part, par la comparaison de son spectre de rmn du ^{13}C avec ceux de la 2-méthyltétrahydro-1,2,3,4 β -carboline **2** et du N-méthyltétrahydropyrrole **6** (4) (Tableau 2) et, d'autre part, par la présence sur le spectre de rmn du ^1H d'un triplet à 3,16ppm (1 H, $J=8\text{Hz}$) correspondant au proton en 2'.

La structure plane de la woodinine, qui apparaît comme originale dans l'ensemble des alcaloïdes β -carboliniques connus, en particulier ceux récemment isolés de *Eudistoma olivaceum*, est donc ainsi établie. En ce qui concerne sa stéréochimie, la courbe de dichroïsme circulaire, qui présente un effet Cotton positif à 243nm, permet de préciser que l'hydrogène en 1 est en position β (10,11).

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel animal: Le matériel animal a été récolté par l'équipe des plongeurs de l'ORSTOM, Nouméa que nous remercions. Un échantillon zoologique est conservé au centre ORSTOM de Nouméa sous la référence UA 29. Nous remercions également Mme F. Monniot du Museum d'Histoire Naturelle de Paris pour l'identification zoologique de cette ascidie.

L'activité antibactérienne moyenne des produits **1** et **2** est exprimée par la mesure du diamètre en mm de la zone d'inhibition de croissance des bactéries autour du disque imprégné (diamètre de 6mm).

Les spectres uv ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer Lambda 5. Le pouvoir rotatoire de la woodinine a été déterminé à 20°C au moyen d'un polarimètre Perkin-Elmer 241 et son spectre de dichroïsme circulaire enregistré sur un dichrographe Jobin-Yvon Mark 5. Les spectres de rmn ont été effectués sur des appareils Bruker WP80 (^1H), VM400 (^1H) ou AC200 (^{13}C); les déplacements chimiques mesurés à partir du TMS ($\delta=0$) sont exprimés en ppm. Les spectres de masse ont été obtenus à l'aide des spectrographes AEI MS 50 et pour la haute résolution MS 902.

Extraction: l'organisme congelé (1,9kg) est broyé et lyophilisé: 335g de matière sèche sont obtenus. 233g de cette poudre sont extraits par EtOH à 80%; l'extrait est concentré sous vide, puis le résidu est repris par l'eau. Cette solution est extraite par CH_2Cl_2 ; cette phase organique est lavée à l'eau, séchée sur Na_2SO_4 et concentrée. Les alcaloïdes sont alors purifiés par passage sous forme de chlorhydrates (HCl 1N), puis de bases (NH_4OH diluée au 1/4). Deux produits **1** et **3** sont alors purifiés à partir de cet extrait d'alcaloïdes totaux par chromatographies successives sur plaques préparatives de silice (CH_2Cl_2 -MeOH 95:5, vapeurs de NH_3).

Bromo-5 N,N-diméthylaminoéthyltryptamine 1 (47mg, 0,02% de l'organisme lyophilisé).
Activité antibactérienne: *S. aureus* (100 μg :12;200 μg :17), *E. coli* (100 μg :17;200 μg :22); SM: m/z (%); 266(M^+ , 4); 208(5); 129(14); 58(100); UV: (EtOH) λ_{max} nm (logE), 227(4,59), 290(3,90),300ép.(3,70); rmn ^1H (CDCl_3 , 80MHz): 9,05(1H, éch. D_2O); 7,57(1H, s large); 7,12(2H, s large); 6,90(1H, s large); 2,80(4H, m); 2,41(s, 6H); ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400MHz):

7,61(1H, d, J=1,8Hz); 7,23(1H, d, J=9Hz); 7,12(1H, s); 7,06(1H, dd, J=9Hz et J=1,8Hz); 2,92(3H, t, J=8Hz); 2,68(3H, t, J=8Hz); 2,35(6H, s); rmn ^{13}C (CDCl_3 - CD_3OD (75:25)): C-1a 139,0; C-2, 124,1; C-3, 115,2; C-3a, 132,7; C-4, 127,3*, C-5, 116,4; C-6, 127,5*; C-7, 116,4; C-1', 25,9; C-2', 63,0; N- CH_3 , 47,3 (*ces valeurs peuvent être interverties).

Woodinine 2 (24mg, 0,01% de l'organisme lyophilisé): Activité antibactérienne: *S. aureus* (100 µg:16;200 µg:18), *E. coli* (100 µg:8;200 µg:11); α_D (MeOH, c=0,6): -38° ; dichroïsme circulaire: λ_{max} nm (ϵ) (MeOH): 243(+4,5.10 $^{-4}$), 283(-2,1.10 $^{-4}$), 315(+1,04.10 $^{-4}$); SM: m/z ($\%$); 347 (M^+ , 2); 263(5); 84(100); UV: (EtOH) λ_{max} nm (log ϵ); 230(4,58); 291(3,93); 300ép.(3,85); rmn du ^1H (CDCl_3 , 400MHz): 9,97(1H, éch. D_2O); 7,52(1H, s large); 7,11(2H, s large); 3,60(1H, s large), 3,16(1H, t, J=8Hz); 2,53(6H, s); ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400MHz): 7,55(1H, d, J=1,8Hz); 7,29(1H, d, J=9Hz); 7,10(1H, dd, J=9Hz et J=1,8Hz); 3,58(1H, s large); 3,13(1H, t, J=8Hz); 2,49(6H, s); rmn ^{13}C (CDCl_3): Tableau 1

BIBLIOGRAPHIE

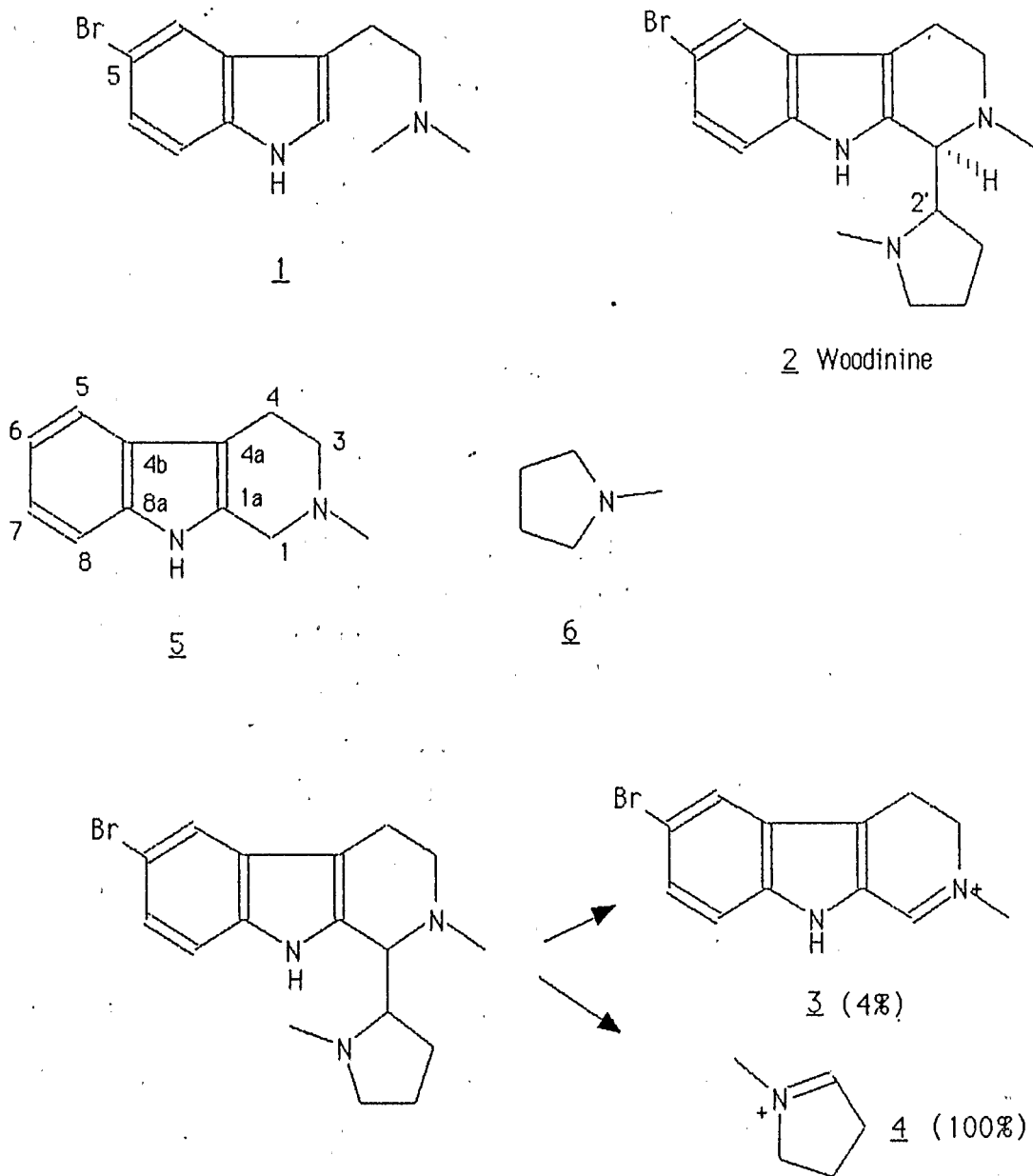
- (1) F. Monniot, Bulletin du Museum d'Histoire Naturelle, France, Série IV, section A, **10**, sous presse (1988)
- (2) R. Verpoorte, J. Nat. Prod., **49**, 1 (1986).
- (3) P. Djura, D.B. Stierle, B. Sullivan, D.J. Faulkner, E. Arnold et J. Clardy, J. Org. Chem., **45**, 1435 (1980)
- (4) M. Shamma et D.M. Hindenlang, "C-13 NMR Shift Assignments of Amines and Alkaloids", Plenum Press (1979)
- (5) K.L. Rinehart, Jr., P.D. Shaw, L.S. Shield, J.B. Gloer, G.C. Harbour, M.E.S. Koker, D. Samain, R.E. Schwartz, A.A. Tymiak, D.L. Weller, G.T. Carter, M.H.G. Munro, R.G. Hughes, Jr., H.E. Renis, E.B. Swynenberg, D.A. Stringfellow, J.J. Vavra, J.H. Coats, G.E. Zurenko, S.L. Kuentzel, L.H. Li, G.J. Bakus, R.C. Brusca, L.L. Craft, D.N. Young et J. L. Connor, Pure & Applied Chemistry, **53**, 795 (1981)
- (6) A.A. Tymiak, K.L. Rinehart, Jr. et G. J. Bakus, Tetrahedron, **41**, 1039 (1985)
- (7) B. Gabbetta et G. Mústich, "Spectral Data of Indole Alkaloids", Iverni Della Beffa, Milan, Italy (1975)
- (8) J. Kobayashi, G.C. Harbour et J. Gilmore, J. Am. Chem. Soc., **106**, 1526 (1984)
- (9) K.L. Rinehart, Jr., J. Kobayashi, G.C. Harbour, J. Gilmore, M. Mascal, T.G. Holt, L.S. Shield et F. Lafargue, J. Am. Chem. Soc., **109**, 3378, (1987)
- (10) K.L. Rinehart, Jr., J. Kobayashi, G.C. Harbour, S.A. Miszak et T.A. Scahill, J. Am. Chem. Soc., **106**, 1524 (1984)

(11) K. Blaha, Z. Kobicova et J. Trojaneek, Coll. Czech. Chem. Commun., **39**, 3168 (1974).

Tableau 2 : comparaison des données de ^{13}C RMN de 2, 5 et 6

C	5(4)	6(4)	2
1	52,5*		60,9
NCH ₃	45,3		43,2°
3	52,0*		53,0
4	21,2		20,2*
1a	132,7		134,1
4a	106,0		108,8
4b	126,6		128,3
5	117,2		120,4
6	118,1		111,9
7	120,1		123,7
8	110,8		112,4
8a	135,8		134,7
2'		56,3	67,3
3'		24,2	25,8
4'		24,2	22,8*
5'		56,3	57,5
NCH ₃		42,1	41,2°

*, ° : Ces valeurs peuvent être inversées dans une même colonne



Schema 1: fragmentation observée sur le spectre de masse de la Woodinine