

BIOSYNTHESE DU CALOPHYLLOLIDE (NEOFLAVANOIDE) SUR L'ORIGINE BIOGENETIQUE DU GROUPEMENT TIGLOYLE*

GERHARD KUNESCH et JUDITH POLONSKY†

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S.91, Gif-sur-Yvette, France

(Received 28 December 1968)

Résumé—Nous rapportons les expériences d'incorporation de la L-[U-¹⁴C]isoleucine, de la L-[U-¹⁴C]leucine et du [1-¹⁴C]acétate de Na dans de jeunes plantules de *Calophyllum inophyllum* L. (Guttiferae). Les résultats obtenus montrent l'incorporation spécifique de la L-[U-¹⁴C]isoleucine dans la chaîne tigloyle du calophyllolide (I). La radioactivité du [1-¹⁴C]acétate a été incorporée dans le noyau de phloroglucinol et dans les carbones C-3 et C-4 du groupement tigloyle. L'étude des produits de dégradation du calophyllolide montre que la L-[U-¹⁴C]leucine a été métabolisée en acétate.

Abstract—Feeding experiments with young shoots of *Calophyllum inophyllum* L. (Guttiferae) using L-[U-¹⁴C]-isoleucine, L-[U-¹⁴C]leucine and [1-¹⁴C]acetate are reported. It has been found that L-[U-¹⁴C]isoleucine is specifically incorporated into the tigloyl side-chain of calophyllolide (I). [1-¹⁴C]acetate is not only incorporated into the phloroglucinol nucleus but also into the carbon atoms C-3 and C-4 of the tigloyl grouping. Degradative experiments have shown that L-[U-¹⁴C]leucine is metabolized to acetate.

Nous avons rapporté précédemment¹ l'incorporation spécifique de la phénylalanine dans l'unité C₆-C₃ du calophyllolide (I),² constituant de *Calophyllum inophyllum* L. (Guttiferae). Les résultats obtenus ont permis de préciser le mode de condensation de cette unité en C₉ avec l'unité phénolique (ou avec le polyacétate équivalent). Le présent mémoire a pour objet l'étude de l'origine biogénétique du groupement tigloyle du calophyllolide.

A l'opposé de néoflavanoïdes³ (dalbergiones et phényl-4 coumarines) isolées des quelques espèces de la famille de Légumineuses, la plupart de phényl-4 coumarines retirées de différentes espèces de la famille de Guttifères, possèdent des groupements alcoyle et acyle sur le noyau de phloroglucinol. Alors que l'on trouve, en général, le même substituant alcoyle (groupement diméthylallyle, souvent engagé dans un cycle diméthyl-2,2 chromène), il n'en est pas de même pour le substituant acyle. Le calophyllolide (I), la mammeisine,⁴ le mésoul⁵ et l'alcoyl-4 coumarine, mamméa B/BB⁶ illustrent la variété des structures du groupement acyle; ils possèdent respectivement un groupement tigloyle, isovaléryle, isobutyryle et α -méthyl butyryle.

* Une partie de ce travail a été présentée au 5e Symposium de Chimie des Substances Naturelles, IUPAC, London 1968 (*Abstract Book*, p. 111).

† Avec la collaboration technique de Mme R. Hildesheim.

¹ G. KUNESCH et J. POLONSKY, *Chem. Commun.* **7**, 317 (1967).

² J. POLONSKY, *C.R. Acad. Sci.* **242**, 2961 (1956); *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1079 (1957); 929 (1958). K. KAWAZU, H. OHIGASHI et T. MITSUI, *Tetrahedron Letters* 2383 (1968).

³ W. D. OLLIS, *Experientia* **22**, 777 (1966).

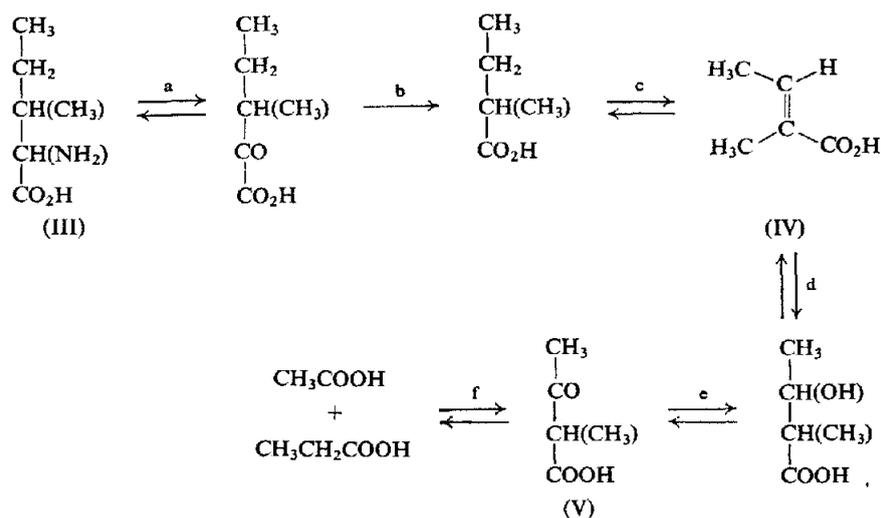
⁴ R. A. FINNEGAN et C. DJERASSI, *Tetrahedron Letters* **13**, 11 (1959).

⁵ D. P. CHAKRABORTY et B. C. DAS, *Tetrahedron Letters* 5727 (1966).

⁶ L. CROMBIE et D. E. GAMES, *J. Chem. Soc. Ser. C*, 2553 (1967).

Le cycle de diméthyl-2,3 chromanone de plusieurs composés de cette famille, comme celui de l'inophyllolide (II),² des tomentolides A et B,⁷ s'est, sans doute, formé par cyclisation d'un groupement tigloyle avec un OH phénolique adjacent. Seules les deux phényl-4 coumarines méthoxylées, le calophyllolide (I) et l'apetalolide,⁷ possèdent une chaîne tigloyle. Si l'acide tiglique se trouve fréquemment dans le règne végétal sous forme d'ester, il est bien plus rare de le trouver engagé dans un groupement C-tigloyle.

On sait que l'acide tiglique est un produit de métabolisme de l'isoleucine (III) dans certains tissus animaux.⁸ Dans le schéma A sont indiquées les réactions significatives de la séquence métabolique de cet amino-acide. La formation de l'acide tiglique (IV) à partir de l'isoleucine a été également démontrée chez les plantes supérieures, notamment chez *Datura meteloides*. La mételoïdine, alcaloïde retiré de cette plante, est un ester tiglique de l'aminoalcool, la teloïdine. L'incorporation spécifique de l'isoleucine dans le groupement tigloyle de cet alcaloïde a été démontrée.⁹ Signalons aussi que l'isoleucine se trouve être le précurseur de l'acide angélique, isomère de l'acide tiglique.^{10*}



Ces faits rendaient très probable l'hypothèse de la formation du groupement tigloyle du calophyllolide et de celui des composés apparentés à partir de l'isoleucine. Remarquons, cependant, que l'on ne pouvait pas exclure, a priori, l'hypothèse antérieurement avancée¹² pour la biosynthèse du groupement tigloyle du calophyllolide: le précurseur serait l'acide méthyl-2 acétoacétique (V), résultant de la C-méthylation de l'acide acétoacétique, qui conduirait par réduction suivie de déshydratation à l'acide tiglique.

* Notons également que l'isoleucine est incorporée spécifiquement dans le groupement hydroxy-2-méthyl-2 butyroyle de la glaucarubinone.¹¹

⁷ S. K. NIGAM, C. R. MITRA, G. KUNESCH, B. C. DAS et J. POLONSKY, *Tetrahedron Letters* 2633 (1967).

⁸ W. G. ROBINSON, B. K. BACHHAWAT et M. J. COON, *J. Biol. Chem.* **218**, 391 (1956).

⁹ W. C. EVANS, *Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin Kl. Chem. Geol. Biol.*, 507 (1966). J. G. WOOLEY, *Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin Kl. Chem. Geol. Biol.*, 531 (1966). E. LEETE et J. B. MURRILL, *Tetrahedron Letters* 1727 (1967).

¹⁰ D. H. CROUT, *J. Chem. Soc. Ser. C*, 1233 (1967).

¹¹ J. MORON et J. POLONSKY, *European J. Biochem.* **3**, 488 (1968).

¹² F. M. DEAN, *Naturally Occurring Oxygen Ring Compounds*, p. 579, Butterworths, London (1963).

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons fait pousser de jeunes plantules de *Calophyllum inophyllum*, d'une part, en présence de [1-¹⁴C]acétate de Na et, d'autre part, en présence de la L-[U-¹⁴C]isoleucine. On isole au bout de 10 jours le calophyllolide que l'on purifie par chromatographies et cristallisations répétées jusqu'à radioactivité constante. Les valeurs de radioactivité obtenues et les pourcentages d'incorporations de l'acétate et de l'isoleucine sont consignés dans le Tableau 1. Afin de localiser la radioactivité, nous avons dégradé le calophyllolide radioactif selon les réactions indiquées dans le schéma B.

TABLEAU 1. VALEURS DE RADIOACTIVITÉ DU CALOPHYLLOLIDE ET POURCENTAGES D'INCORPORATION

Précurseur	Radioactivité	Incorporation
L-[U- ¹⁴ C]isoleucine	4,57.10 ⁶ dpm/mmmole	1,5%
[1- ¹⁴ C]acétate de sodium	1,84.10 ⁵ dpm/mmmole	0,02%
L-[U- ¹⁴ C]leucine	8,03.10 ⁵ dpm/mmmole	0,26%

Le traitement du calophyllolide par SO₄H₂ à 70%¹³ fournit l'acide tiglique avec bon rendement. Le produit désacylé a pu être isolé sous forme de son dimère (VI), C₄₂H₃₆O₈ (M⁺ = 668), F = 335° (décomp.). Sa structure ressort essentiellement de l'étude de son spectre de R.M.N. à 100 Mc* (voir partie expérimentale), et le mécanisme de sa formation est probablement analogue à celui de la dimérisation de lapachenole en isolapachenole.¹⁴ Comme le calophyllolide, le dimère (VI) fournit de l'acide benzoïque par oxydation à l'acide chromique. L'ozonisation de l'acide tiglique donne l'acétaldéhyde qui a été isolé sous forme de son dérivé de dimédon. Enfin, la dégradation du calophyllolide par la potasse à 40% fournit l'hydroxy-5 méthoxy-7 phényl-4 coumarine (VII).¹⁵

Dans le Tableau 2 sont consignées les valeurs de radioactivité de ces différents produits de dégradation. Les valeurs de Tableau 2 montrent que la totalité de la radioactivité du calophyllolide, isolé après incorporation de la L-[U-¹⁴C]isoleucine, se trouve pratiquement dans l'acide tiglique. L'absence de radioactivité dans le produit désacylé (VI) montre que l'isoleucine n'a pas été dégradé en acétate qui est le produit de son catabolisme complet. L'isoleucine peut donc être considérée comme précurseur du groupement tigloyle du calophyllolide.

Le calophyllolide, isolé après incorporation de [1-¹⁴C]acétate de Na, fournit également de l'acide tiglique radioactif (32%); toute la radioactivité de cet acide a été retrouvée dans l'acétaldéhyde obtenu lors de son ozonolyse. Ce résultat est en accord avec la séquence des réactions présentées dans le schéma A (f→e→d) et il exclut également la biosynthèse du groupement tigloyle via l'acide acétoacétique qui, elle, impliquerait évidemment deux unités d'acétate.

Le Tableau 2 montre aussi que la radioactivité du [1-¹⁴C]acétate de Na se retrouve essentiellement dans le noyau de phloroglucinol.

On peut envisager deux voies pour la formation de tigloyl-phloroglucinol: (1) condensation d'une unité de tiglate avec trois unités de malonates, suivie de cyclisation; (2) condensa-

* Ce spectre a été mesuré aimablement par Mme L. Lacombe (Collège de France).

¹³ R. A. FINNEGAN, B. GILBERT, E. J. EISENBRAUN et C. DJERASSI, *J. Org. Chem.* **25**, 2169 (1960).

¹⁴ W. D. COTTERILL, R. LIVINGSTONE, K. D. BARTLE et D. W. JONES, *Tetrahedron* **24**, 1981 (1968).

¹⁵ J. POLONSKY, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 541 (1955).

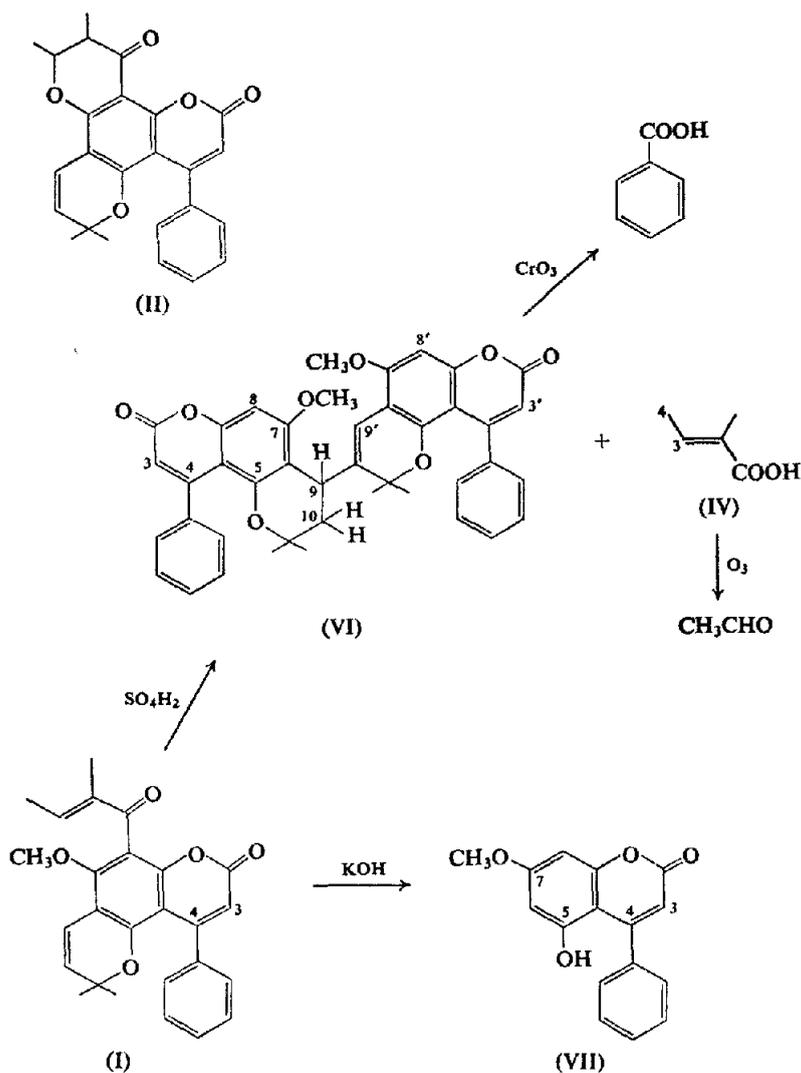


SCHÉMA B

tion d'une unité de tiglate avec un noyau de phloroglucinol préformé. On peut citer en faveur de la dernière voie de biosynthèse les arguments suivants: (a) une phényl-4 coumarine dépourvue de groupement acyle, nommée *ponnalide*, a été trouvée par Seshadri et coll.¹⁶ dans les fruits verts de *C. inophyllum*. (b) Dans le cas du calophyllolide, isolé après incorporation du [1-¹⁴C]acétate de Na, la radioactivité de l'acide tiglique (32%: 1 acétate) est relativement plus élevée que celle du noyau de phloroglucinol (50%: 3 acétates). (c) La cyclisation d'un substituant tigloyle avec un OH phénolique en *ortho* est très aisée; dans le cas du calophyllolide, on peut supposer que le groupement tigloyle s'est fixé en *ortho* d'un méthoxyle porté par un noyau de phloroglucinol préformé.

¹⁶ D. ADINARAYANA et T. R. SESHADRI, *Bull. Natl. Inst. Sci., India* 91 (1965).

TABLEAU 2.

Composés	A		B		C	
	I	II	I	II	I	II
Calophyllolide (I)	2,06	100	1,84	100	2,60	100
Dimère (VI)	0,07	<4	1,25	68	2,23	86
Acide tiglique (IV)	2,00	97	0,60	32	0,25	10
Acide benzoïque			0,03	<1	0,01	<1
Acide tiglique (IV)			0,34			
Acétaldéhyde (Dérivé de dimédon)			0,34	32		
Calophyllolide (I)			1,27		2,60	
Coumarine (VII)			0,75	59	2,32	89

Précurseur de l'expérience A: L-[U-¹⁴C]isoleucine, de B: [1-¹⁴C]acétate de Na, de C: L-[U-¹⁴C]leucine. Colonne (I): valeurs de radioactivité exprimées en dpm/mmole $\times 10^{-5}$. Colonne (II): valeurs exprimées en % de la radioactivité totale.

Quant au cycle diméthyl-2,2 chromène du calophyllolide, on peut envisager deux modes pour sa formation:

- cyclisation d'un groupement diméthylallyle avec un OH phénolique en *ortho*, suivie d'une déshydrogénation ou cyclisation après oxydation préalable de ce groupement.
- cyclisation d'un groupement β -méthylcrotonyle avec un OH en *ortho*, suivie d'une réduction et déshydratation de la diméthyl-2,2 chromanone formée.

Plusieurs expériences différentes d'incorporation de l'acide DL-[2-¹⁴C]mévalonique, précurseur biogénétique du groupement diméthylallyle, n'ont conduit qu'à du calophyllolide très peu radioactif. Nous avons alors effectué des essais d'incorporation de la [U-¹⁴C]-leucine. On sait, en effet, que l'acide mévalonique aussi bien que l'acide β -méthyl crotonique peuvent être biosynthétisés à partir de cet amino-acide. Les valeurs de radioactivité trouvées dans les produits de dégradation du calophyllolide radioactif, isolé après incorporation de la [U-¹⁴C]leucine, montrent que ce précurseur possible était métabolisé en acétate (voir Tableau 2).

En résumé, nos expériences de biosynthèse du calophyllolide, effectuées jusqu'à présent, ont prouvé l'incorporation spécifique de la phénylalanine dans l'unité C₆-C₃, de l'isoleucine dans le groupement tigloyle et de l'acétate dans les carbones C-3 et C-4 de ce dernier groupement ainsi que dans le noyau du phloroglucinol.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion pris avec l'appareil de Kofler ne sont pas corrigés.

Les mesures de radioactivité ont été effectuées sur un compteur à scintillation "Nuclear Chicago" modèle 6.860, équipé d'un dispositif de standardisation externe. Les échantillons radioactifs sont dissous dans le toluène scintillant [naphthalène, 100 g, diphényl-2,5 oxazole (PPO), 6 g; 1,4-bis,2-(4-méthyl-5-phényl-oxazolyl)-benzène (diméthyl -POPOP), 300 mg; pour 1 l. de toluène]. Le rendement de l'appareil a été calculé pour chaque mesure à l'aide du standard externe, grâce à une courbe étalon. Ce rendement varie de 80 à 82% pour le ¹⁴C. Toutes les activités spécifiques sont exprimées en désintégrations/60 sec/mmole. L'erreur relative est estimée à moins de 3%.

La chromatographie en couche mince (C.C.M.) a été effectuée sur des couches de gel de silice G (Merck). Le système de solvants utilisé est, en général, le mélange: benzène-acétate d'éthyle (95:5); la révélation est faite par fluorescence à la lampe u.v.

Culture des Plantes et Administration des Précurseurs

Les graines fraîches de *Calophyllum inophyllum* ont été aimablement mises à notre disposition par l'Institut Malgache de Recherches Appliquées, Tananarive (Madagascar).

Les précurseurs radioactifs: le $[1-^{14}\text{C}]$ acétate de Na, la L- $[U-^{14}\text{C}]$ isoleucine et la L- $[U-^{14}\text{C}]$ leucine proviennent du Commissariat à l'Énergie Atomique, Saclay (France); la lactone DL- $[2-^{14}\text{C}]$ mévalonique provient de "Radiochemical Centre", Amersham, Bucks.

Les graines fraîches et décortiquées de *C. inophyllum* sont mises à germer au Phytotron de Gif-sur-Yvette ($t^\circ = 30^\circ$; humidité = 70%). Quinze plantules âgées de 4 semaines, atteignant une hauteur de 3 à 5 cm, sont placées dans une petite gouttière contenant 15 cm³ d'eau. On y ajoute directement les précurseurs radioactifs en solution aqueuse. L'eau est absorbée en 12 hr environ et elle est renouvelée pendant toute la période d'incorporation. La durée des incorporations a été de 10 jours au bout desquels toute la radioactivité de la L- $[U-^{14}\text{C}]$ leucine (0,1 mc), du $[1-^{14}\text{C}]$ acétate de Na (0,2 mc), de la L- $[U-^{14}\text{C}]$ leucine (0,1 mc) et plus de 90% de celle de l'acide mévalonique (0,1 mc) a été absorbée.

Isolement du Calophyllolide

Les plantes, récoltées après 10 jours et dont les racines ont été préalablement lavées à l'eau distillée, sont finement broyées et séchées, puis extraites par l'éther de pétrole dans un Soxhlet. Le résidu obtenu après évaporation du solvant est chromatographié sur 20 fois son poids de gel de silice-célite (9:1). La colonne est développée par un mélange de benzène contenant un pourcentage croissant d'acétate d'éthyle. Le calophyllolide, élué, en général, par du benzène contenant 4% d'acétate d'éthyle, est cristallisé dans le méthanol, puis dans un mélange d'éther et d'éther de pétrole.

*Dégradation du Calophyllolide**

Obtention du dimère (VI) et de l'acide tiglique (IV). 184 mg de calophyllolide sont dissous, en agitant à la température ambiante, dans 10 cm³ de SO₄H₂ à 70%. On continue l'agitation pendant 5 hr, au cours desquelles un précipité se forme. Le mélange réactionnel est alors versé sur de la glace pilée. Le précipité jaune formé est essoré, lavé et séché. Les 135 mg de produit ainsi obtenu sont chromatographiés sur 4 g de gel de silice. 100 cm³ de CHCl₃ éluent 35 mg de produit qui cristallisent dans l'acétate d'éthyle. Après sublimation, sous 0,01 mm à 300° (t° du bain d'air), on obtient des cristaux jaunâtres qui se décomposent vers 335°. Il s'agit du dimère (VI).

Spectre de masse (A.E.I. MS9): Pic moléculaire à m/e 668; pics à m/e 653 (M-CH₃), à m/e 335 ($\frac{1}{2}M^+ + 1$).

Spectre de R.M.N. (dans CDCl₃ à 100 Mc): 4 méthyles tertiaires [singulets (3H chacun) à 0,68; 0,54; 0,98 et 1,1 ppm], 2 méthoxyles [singulets (3H chacun) à 3,66 et 3,8 ppm]. H₃ et H₃, (singulets à 5,93 et 5,97 ppm). H₈ et H₈, (singulets à 6,43 et 6,4 ppm). H₉, (singulet à 5,9 ppm). H₉ [multiplet (1H) centré à 3,36 ppm]. 2H₁₀ [multiplet (2H) entre 1,51 et 2,05 ppm]; ces derniers protons donnent un quadruplet après l'élimination du couplage avec le proton H₉ par une expérience de double résonance.

Le filtrat acide, obtenu après séparation du précipité ci-dessus, est épuisé, en continu, par de l'éther. L'extrait éthéré fournit, après évaporation du solvant, 37 mg de cristaux d'acide tiglique que l'on purifie par sublimation à 55°/15 mm; on obtient ainsi des cristaux F=64°.

Oxydation du dimère (VI) par l'acide chromique. Une suspension de 70 mg du dimère (VI) dans 1 cm³ d'acétone est additionnée de 2 cm³ d'une solution d'acide chromique (contenant 20 g de CrO₃ et 30 cm³ de SO₄H₂ concentré par 100 cm³). Après un contact de 48 hr à la température ambiante, on dilue par l'eau et on extrait à l'éther. La partie acide, séparée par lavages avec une solution de CO₃HNa, fournit 15 mg de produit cristallin. Par sublimation à 110°/15 mm on obtient des cristaux d'acide benzoïque, F=120°.

Ozonisation de l'acide tiglique (IV). Une solution de 30 mg d'acide tiglique dans 10 cm³ de CCl₄, refroidie à -20°, est soumise à l'action d'un courant d'oxygène ozonisé pendant 15 mn. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on ajoute 10 cm³ d'eau. On porte le tout à l'ébullition et on recueille le distillat dans une solution aqueuse de dimédon à 0,4%. Après avoir gardé cette solution pendant 24 hr au réfrigérant, on essore le précipité formé. Le produit de consensation avec le dimédon est purifié par sublimation à 120°/0,01 mm et par chromatographie préparative sur couche mince [système: CHCl₃ + acétate d'éthyle (5:1)]. On obtient ainsi des cristaux F=141°.

Obtention de l'hydroxy-5 méthoxy-7-phényl-4 coumarine (VII). 141 mg de calophyllolide sont additionnés de 20 cm³ de KOH aqueuse à 40% et le tout est chauffé à l'ébullition sous un courant d'azote pendant 6 hr. On acidifie alors par l'acide chlorhydrique. Après un repos de 24 hr au frigidaire, on essore le précipité formé que l'on chromatographie sur gel de silice (Merck). 51 mg de produit cristallisé sont élués par du chloroforme que l'on purifie par sublimation à 200°/0,01 mm. On obtient ainsi des cristaux de (VII), F=204-207°.

Remerciements—Nous adressons nos vifs remerciements au Dr. P. Boiteau (E.P.H.E., Faculté de Médecine de Paris) et à M. L. Rakotoson (I.M.R.A., Tananarive) pour nous avoir procuré les graines fraîches de *Calophyllum inophyllum* L., au Dr. B. C. Das pour la discussion des spectres de masse et à Mme L. Alais pour l'obtention des spectres de R.M.N. Nous remercions le Commissariat à l'Énergie Atomique (Saclay) pour une subvention ayant facilité l'achat des substances radioactives.

* Nous décrivons un exemple de chacune des expériences de dégradation.