

IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU STÉRIDE ET D'UN HÉTÉROSIDE BACTÉRIOLOGIQUEMENT ACTIF DANS LES FEUILLES DE LA PLANTE *AJUGA PSEUDOIVA*

A. CHAARI*, H. BEN JANNET*, M. T. MARTIN**, Z. MIGHRI*

* *Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Synthèse Organique,
Faculté des Sciences de Monastir, 5000 Monastir, Tunisie.*

** *Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France.*

(Soumis en mai 1998, accepté en octobre 1998)

RESUME :

Un nouveau stéride 3-O-butanoylcélostérol et un hétéroside 3 β -O-[β -D-glucoside] célostérol bactériologiquement actif ont été identifiés dans les feuilles de la plante *Ajuga pseudoiva*.

Mots clés : *Ajuga Pseudoiva*, Labiées, stéride, hétéroside, Mighavide.

ABSTRACT :

A new steroid clerosterol 3-O-butanoyl and a sterol glycoside clerosterol 3 β -O-[β -D-glucoside] active against bacteria have been identified in *Ajuga pseudoiva* leaves.

Keyword : *Ajuga Pseudoiva*, Labiatae, steroid, heteroside, Mighavide.

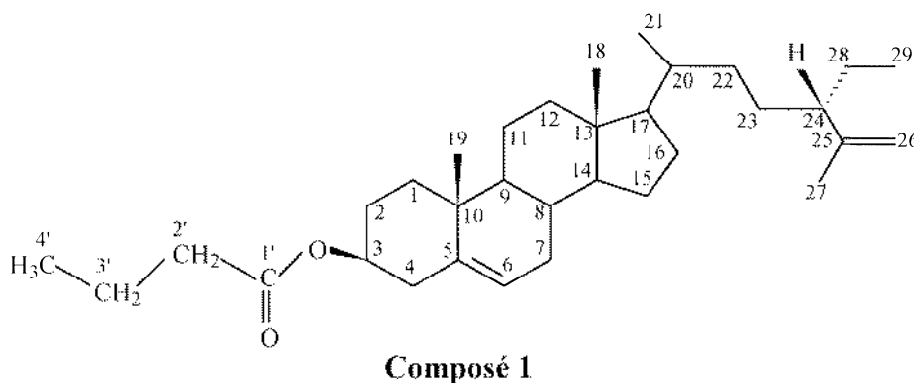
INTRODUCTION :

Le présent travail constitue une contribution à l'étude biologique et chimique des plantes médicinales poussant en TUNISIE visant la possibilité de découvrir de nouvelles substances naturelles biologiquement et pharmacologiquement actives [1-6]. Il porte principalement sur l'étude chimique des extraits acétonique et méthanolique des feuilles séchées de la plante *Ajuga pseudoiva* (Labiées). L'activité antibactérienne intéressante présentée par ces extraits vis-à-vis de quelques souches pathogènes nous a incités à entamer des études chromatographiques ayant permis l'isolement d'un nouveau stéride nommé Mighavide et d'un hétéroside, bactériologiquement actif, signalé pour la première fois non seulement dans l'espèce *iva* mais dans le genre *Ajuga*. Les structures de ces substances naturelles ont été élucidées à l'aide des techniques spectroscopiques telle que la RMN 2D

(COSY, XH Corr, HMQC, HMBC et NOESY) ainsi que par comparaison des données spectrales avec celles de la littérature [6, 7].

RESULTATS ET DISCUSSION :

Composé 1 : La formule brute retenue et déduite du spectre de masse en IE est identifiée à $C_{33}H_{54}O_2$ (M^{+} m/z 482). La comparaison du spectre de RMN 1H du composé **1** avec celui du clérostérol isolé dans notre laboratoire du même extrait acétonique des feuilles séchées de la plante *Ajuga pseudoiva* [6] a montré que les zones allant de 0,60 à 1,60 ppm et de 4,40 à 5,40 ppm sont presque superposables.



Cette comparaison a aussi permis de noter la disparition, sur le spectre de RMN 1H du composé **1**, du multiplet à 3,50 ppm relative au proton H_3 porté par le carbone hydroxylé dans le clérostérol [6], l'apparition de deux nouveaux triplets à 0,94 ppm et à 2,25 ppm et de deux nouveaux multiplets vers 1,65 ppm et 4,60 ppm. Ces nouveaux signaux ainsi que les corrélations 1H - 1H relevées du spectre COSY du composé **1** ont permis la détermination de la structure du groupement butanoyle. En effet, le triplet ($\delta = 2,25$ ppm, $J = 8,57$ Hz) est attribuable au méthylène $(CH_2)_{2'}$ directement lié d'une part au carbonyle de la fonction ester et d'autre part au deuxième méthylène $(CH_2)_{3'}$ dont les protons correspondent au multiplet apparaissant à $\delta = 1,65$ ppm. Le triplet ($\delta = 0,94$ ppm, $J = 8,57$ Hz) correspond au groupement méthyle terminal $(CH_3)_{4'}$.

Les taches de corrélation H_2 - H_3 ' et H_3 '- H_4 ' observées sur le spectre COSY du Mighavide justifient l'enchaînement proposé (CH_3 - CH_2 - CH_2 - CO -). Les déplacements chimiques des carbones $C_{2'}$, $C_{3'}$ et $C_{4'}$ ont été déduits du spectre XH Corr et confirmés par les spectres de RMN ^{13}C et DEPT 135 qui prouvent à leurs tours la présence de la fonction ester ($C_{1'}$, $\delta = 173,13$ ppm).

La structure du reste de la molécule a été déduite par comparaison des déplacements chimiques de certains protons et carbones du Mighavide (tableau I) avec ceux du clérostérol [6].

La structure proposée du composé **1** a été appuyée par l'étude du spectre de masse en IE ayant permis l'observation du pic ionique à m/z 394 relatif à la perte d'une molécule d'acide butanoïque, du pic ionique à m/z 71 correspondant à la rupture de la liaison CO-O laissant la charge sur le carbonyle et du pic ionique intense à m/z 43 facilement attribuable à l'ion fragment propyle.

Tableau I
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) et ^{13}C (75,47 MHz, CDCl_3) du composé **1**

H	δ (ppm)	multiplicité	J (Hz)	C	δ (ppm)
				C_1	37,08
				C_2	31,93
H_3	4,65	m		C_3	73,71
				C_4	38,25
				C_5	139,79
H_6	5,35	m		C_6	122,63
				C_7	31,93
				C_8	31,99
				C_9	50,11
				C_{10}	37,15
				C_{11}	20,88
				C_{12}	39,81
				C_{13}	42,38
				C_{14}	56,10
				C_{15}	24,35
				C_{16}	28,22
				C_{17}	56,76
H_{18}	0,66	s		C_{18}	11,89
H_{19}	1,00	s		C_{19}	19,38
				C_{20}	35,61
H_{21}	0,88	d	6,32	C_{21}	18,72
				C_{22}	29,78
				C_{23}	29,47
				C_{24}	49,60
				C_{25}	147,58
				C_{26}	111,43
H_{26a}	4,70	ls		C_{27}	17,85
H_{26b}	4,61	ls		C_{28}	26,60
H_{27}	1,55	s		C_{29}	12,10
H_{29}	0,80	t	7,17	$\text{C}_{1'}$	173,13
H_2	2,25	t	8,57	C_2'	36,65
H_3'	1,65	m		C_3'	18,60
H_4'	0,94	t	8,57	C_4'	13,69

Composé 2 : Isolé sous forme d'une poudre blanche. La polarité relativement forte de ce composé ainsi que les signaux difficilement attribuables apparaissant dans la zone 3-4 ppm de

fig 1. Agrandissement de la région (0,6-2,4 ppm ; 10-60 ppm) du spectre HMQC du composé 2a

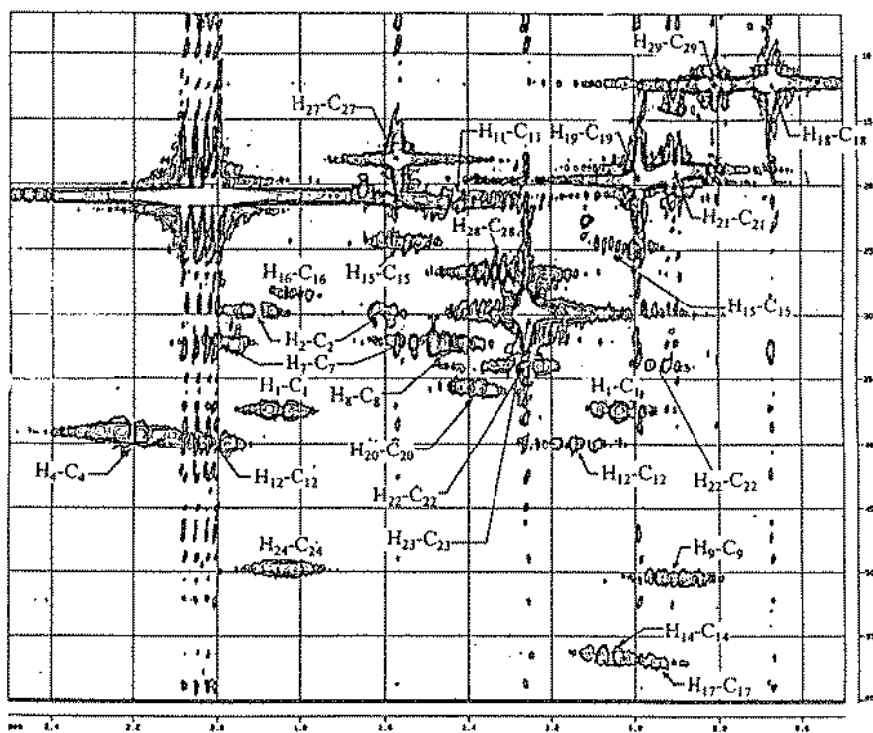
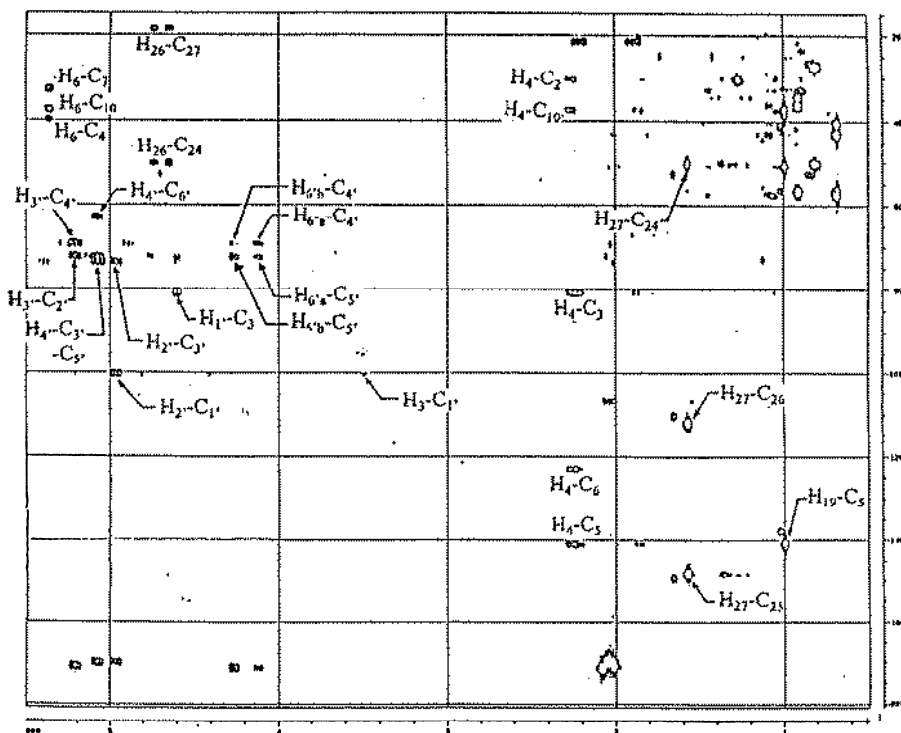
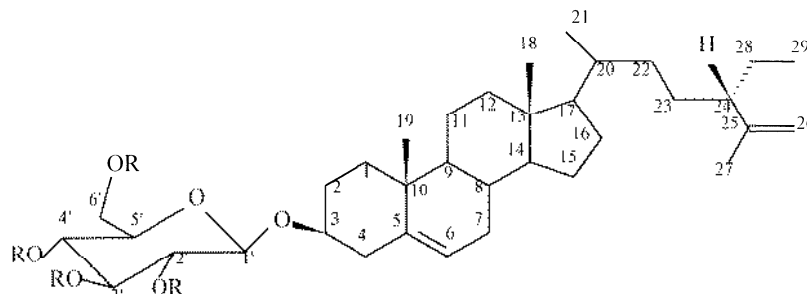


fig 2. Spectre HMBC du composé 2a



son spectre RMN du proton enregistré à 300 MHz dans le CDCl_3 additionné de quelques gouttes de CD_3OD nous ont motivés à l'acétyle par de l'anhydride acétique en présence de pyridine.



composé	R
2	H
2a	CH₃-CO

L'étude du spectre de RMN ^1H du dérivé acétylé **2a** a permis de voir en particulier, la disparition de quelques signaux de la région 3-4 ppm, l'apparition de quatre singulets d'intégration trois protons chacun dans la zone 2-2,2 ppm attribuables aux protons méthyliques de quatre groupements acétyle ainsi que l'apparition de nouveaux signaux dans la région 4,9-5,3 ppm qui ne pourront correspondre qu'aux protons portés par les carbones hydroxylés dans le cas du composé **2**. Ce qui a permis de penser à une structure hétérosidique pour le composé **2**.

Le spectre de masse en IE du dérivé acétylé **2a** ainsi que les recherches bibliographiques [7] ont permis de retenir la formule brute $\text{C}_{43}\text{H}_{66}\text{O}_{10}$ de poids moléculaire 742.

La structure du sucre lié à la génine a été établie en se basant sur les corrélations relevées des spectres COSY, HMQC et HMBC. En effet, les corrélations proton-proton $\text{H}_1\text{-H}_2$, $\text{H}_2\text{-H}_3$, $\text{H}_3\text{-H}_4$, $\text{H}_4\text{-H}_5$, $\text{H}_5\text{-H}_{6\text{a}}$ et $\text{H}_5\text{-H}_{6\text{b}}$ observées sur le spectre COSY et comparées avec celles de la littérature [7] ainsi que les corrélations proton-carbone $\text{H}_2\text{-C}_1$, $\text{H}_2\text{-C}_3$, $\text{H}_3\text{-C}_2$, $\text{H}_3\text{-C}_4$, $\text{H}_4\text{-C}_3$, $\text{H}_4\text{-C}_5$, $\text{H}_4\text{-C}_6$, $\text{H}_{6\text{a}}\text{-C}_4$, $\text{H}_{6\text{b}}\text{-C}_4$, $\text{H}_{6\text{a}}\text{-C}_5$ et $\text{H}_{6\text{b}}\text{-C}_5$ déduites du spectre HMBC ont permis d'opter pour une structure glucosidique. L'étude du spectre NOESY du dérivé acétylé **2a** et la comparaison des nOes relevés avec ceux de la littérature [7] ont permis de conclure qu'il s'agit d'un $\beta\text{-D}$ -glucose.

La nature de ce saccharide a été confirmée par l'observation sur le spectre de masse en IE du pic ionique à m/z 411 attribuable à la perte du glucose et du pic ionique à m/z 331 soit 411 uma plus bas que l'ion parent à m/z 742 relatif à la perte de l'aglycone.

L'étude des spectres 1D et 2D (fig1 et fig2) du dérivé acétylé **2a** et la comparaison des données spectrales (tableau II) avec celles de la littérature [7] ont permis de proposer pour l'aglycone la structure du clérostérol : (24S)-28-méthyl-25-méthylènecholest-5-én-3-ol.

Les résultats des tests bactériologiques sont résumés dans le tableau III. En effet, la comparaison de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (30 mg l^{-1}) relative au composé **2** ainsi qu'à son dérivé acétylé **2a** avec celle habituellement utilisées dans le cas des antibiotiques [8] a permis de conclure que ces deux composés présentent une activité inhibitrice appréciable vis-à-vis du *Salmonella typhimurium* et plus particulièrement vis-à-vis du *Pseudomonas aeruginosa* germe très résistant aux antibiotiques et aux antiseptiques.

Tableau II
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) et ^{13}C (déduit du spectre HMQC) du composé **2a**

H	δ (ppm)		multiplicité	J (Hz)	C	δ (ppm)
	α	β				
H ₁	1,06	1,85			C ₁	37,44
H ₂	1,60	1,89			C ₂	30,27
H ₃	3,48		m		C ₃	80,28
H ₄	2,20		m		C ₄	39,16
H ₆	5,35		m		C ₅	141,00
H ₇	1,54	1,98			C ₆	122,39
H ₈	1,43				C ₇	32,34
H ₉	0,90				C ₈	32,23
H ₁₁	1,45				C ₉	50,31
H ₁₂	1,14	2,01			C ₁₀	37,66
H ₁₄	1,06				C ₁₁	21,38
H ₁₅	1,00	1,55			C ₁₂	40,36
H ₁₆	1,80				C ₁₃	42,41
H ₁₇	0,95				C ₁₄	56,58
H ₁₈	0,66		s		C ₁₅	24,36
H ₁₉	0,98		s		C ₁₆	28,40
H ₂₀	1,37				C ₁₇	56,91
H ₂₁	0,90		d	6,30	C ₁₈	12,08
H _{22a}	0,91				C ₁₉	19,68
H _{22b}	1,25				C ₂₀	35,85
H ₂₃	1,26				C ₂₁	18,93
H ₂₄	1,84				C ₂₂	33,93
H _{26a}	4,63		ls		C ₂₃	29,79
H _{26b}	4,72		ls		C ₂₄	49,68
H ₂₇	1,56		s		C ₂₅	148,66
H ₂₈	1,33				C ₂₆	111,55
H ₂₉	0,80		t	7,15	C ₂₇	17,98
H _{1'}	4,59		d	7,90	C ₂₈	26,70
H _{2'}	4,96		t	9,51	C ₂₉	12,29
H _{3'}	5,20		t	9,38	C _{1'}	99,86
H _{4'}	5,08		t	9,50	C _{2'}	71,83
H _{5'}	3,68		m		C _{3'}	73,24
H _{6'a}	4,11		m		C _{4'}	68,87
H _{6'b}	4,29		m		C _{5'}	71,97
					C _{6'}	62,39

Tableau III
Résultats des activités antibactériennes des extraits des feuilles
d'*Ajuga pseudoiva*, des composés 1, 2 et 2a

Echantillon	Concentration	Escherichia Coli	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus	Salmonella typhimurium
Extrait à l'éther de pétrole	500 mg ^l ⁻¹	-	-	-	-
Extrait au dichlorométhane	500 mg ^l ⁻¹	-	-	-	-
Extrait acétonique	500 mg ^l ⁻¹	+	+	+	+
Extrait méthanolique	500 mg ^l ⁻¹	+	+	+	+
Extrait aqueux	500 mg ^l ⁻¹	+	-	-	-
Composé 1	50 mg ^l ⁻¹	-	-	-	-
Composé 2	50 mg ^l ⁻¹	-	+	-	+
	30 mg ^l ⁻¹		+		+
	20 mg ^l ⁻¹		-		-
Composé 2a	50 mg ^l ⁻¹	-	+	-	+
	30 mg ^l ⁻¹		+		+
	20 mg ^l ⁻¹		-		-

+ : présence d'une activité antibactérienne.

- : absence d'une activité antibactérienne.

PARTIE EXPERIMENTALE :

La plante *Ajuga pseudoiva* a été récoltée au mois de février 1997 de la région de Ain Batria (gouvernorat de Zaghuan) et identifiée à l'Ecole Supérieur d'Horticulture, Chott Mirriam (Université du centre, Sousse, Tunisie) par le Dr Fethia SKIRI.

- Extraction :

Les feuilles séchées et finement broyées ont été soumises à des extractions successives dans un appareil de soxhlet par cinq solvants de degrés de polarité croissante, l'éther de pétrole, le dichlorométhane, l'acétone, le méthanol et l'eau dans le but de localiser l'activité antibactérienne et aussi de faciliter les séparations chromatographiques.

- Isolement :

Composé 1 : L'extrait acétonique bactériologiquement actif a été simplifié en quatre grandes fractions sur colonne de gel de silice (Merck 7734) éluée par de l'hexane, hexane/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH et MeOH. Le résidu actif obtenu par extraction avec de l'hexane de la

troisième fraction biologiquement active a été fractionnée sur colonne de gel de silice (Merck 7734) en 64 fractions. Le mélange actif des fractions de 5 à 9 issues de cette dernière colonne a été fractionné sur plaques préparatives de gel de silice (Merck 7747) permettant l'isolement du composé **1** (30 mg) bactériologiquement inactif purifié par recristallisation dans le mélange AcOEt/MeOH 5 :95.

Composé 2 : L'extrait à l'acétate d'éthyle bactériologiquement actif de l'extrait méthanolique a été simplifié en quatre grandes fractions sur colonne de gel de silice (Merck 7734) éluée par de l'éther de pétrole/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH et MeOH. La quatrième fraction bactériologiquement active a été fractionnée sur colonne de gel de silice (Merck 7734) en 451 fractions testées à leurs tours vis-à-vis des bactéries choisies toujours dans le but de localiser l'activité antibactérienne.

Le solide actif obtenu par épuisement du mélange actif des fractions de 53 à 90 par de l'acétone glacée a été fractionné sur colonne de gel de silice (Merck 7734) en 21 fractions. Le mélange actif des fractions de 13 à 15 purifié au départ sur plaques préparatives de gel de silice (Merck 7747) puis sur colonne de gel de silice (Merck 9385) a donné le composé **2** (45 mg) bactériologiquement actif.

- Techniques et appareillages :

Les spectres de RMN ^1H , ^{13}C 1D et 2D ont été enregistrés sur des spectromètres Brüker "AC-300" (300 MHz) et "AMX-400" (400 MHz). Le CDCl_3 est toujours employé comme solvant (additionné de quelques gouttes de CD_3OD dans certains cas). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne. Les constantes de couplage sont indiquées en Hz.

Les spectres de masse en IE ont été réalisés sur un spectromètre MS50.

Le spectre IR du composé **2a** a été enregistré sur un spectromètre Nicolet 205 IR-FT en film liquide sur pastilles de NaCl.

Les points de fusion ont été pris à l'aide d'un appareil à capillaires Büchi-510.

Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés au moyen d'un polarimètre Perkin elmer 241 MC.

Composé 1 : Solide blanc (30 mg), $[\alpha]_D^{20} -20,1$ ($c = 0,4$; CHCl_3), $\text{pf} = 102$ °C, SM.IE m/z $[\text{M}^{+}]$ 482, 349, 83, 81, 71, 69, 57, 55, 43, 41. RMN ^1H et ^{13}C voir tableau I.

Composé 2a : Poudre blanche (45 mg), $[\alpha]_D^{20} -14,48$ ($c = 1,45$; CHCl_3), $\text{pf} = 108$ °C, IR vcm^{-1} 2935, 2867, 1757, 1377, 1038, SM.IE m/z $[\text{M}^{+}]$ 742, 411, 393, 331, 213, 180, 179. RMN ^1H et ^{13}C voir tableau II.

REMERCIEMENTS : Nous remercions Madame le professeur Amina BAKHROUF pour nous avoir accueilli dans son laboratoire de microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Monastir et supervisé les études bactériologiques que nous avons effectuées.

Nous remercions également Madame le Dr Fethia SKIRI (Ecole Supérieur d'Horticulture, Chott Mirriam, Sousse, TUNISIE) pour l'identification botanique de la plante étudiée.

BIBLIOGRAPHIE :

- [1] B. Ben Hassine, A. M. Bui et Z. Mighri, *J. Soc. Chim. Tun.* **1982**, 7, 3-10.
- [2] B. Ben Hassine, A. M. Bui, Z. Mighri et A. Cave, *Plant. Med. Phytother.* **1982**, 16(3), 197-205.
- [3] M. Askri, A. M. Bui et Z. Mighri, *J. Soc. Chim. Tun.* **1982**, 8, 23-28.
- [4] M. Askri, Z. Mighri, A. M. Bui, B. C. Das et P. J. Hylands, *J. Nat. Prod.* **1989**, 52(4), 792-793.
- [5] H. Ben Jannet, Z. Mighri, L. Serani, O. Laprevote, J. C. Jullian and F. Roblot, *Nat. Prod. Lett.* **1997**, 10, 157-164.
- [6] H. Ben Jannet, A. Chaari, M. T. Martin and Z. Mighri, soumise au *J. Soc. Chim. Tun.* **1998**.
- [7] P. Goswami, J. Kotoky, Z-M. Chen and Y. Lu, *Phytochemistry* **1996**, 40(1), 279-281.
- [8] Y. A. Chabbert, *Données actuelles sur la résistance des bactéries aux antibiotiques*, Act. Pharm. Masson édit. Paris **1973**, 26, 27-60.