

Isolement et identification de la 9- β -D-ribofuranosyl-6-aminopurine des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* M. Gilbert

Jean Noël KÉÏTA^{1*}, Donatien KONE², Aboul Karim ALIOU², Amidou DOUCOURE²
et Julian GARCIA³

¹ Université de Ségou, Institut Universitaire de Formation Professionnelle (IUF), BP 24, Mali

² Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako,
Faculté des Sciences et Techniques, Département de chimie, Mali

³ U.J.F, Service DCM-Bât Campus Nanobio, BP 53-3804 Grenoble Cedex 9, France

* Correspondance, courriel : jeannoelkeita@gmail.com

Résumé

La purification par les techniques chromatographiques successives sur colonne (CC) et sur couche mince (CCM) de la phase de butanol de l'extrait hydrométhanolique des fleurs *Vernonia galamensis* de Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* a permis l'isolement de la 9- β -D-ribofuranosyl-6-aminopurine ou adénosine. L'identification a pu être menée à bien grâce aux spectres RMN 1D (¹H, ¹³C), 2D (COSY et HMQC) et enfin grâce à l'analyse en ESI-SM en mode positif.

Mots-clés : adénosine, phase de butanol, fleurs, *Vernonia galamensis*.

Abstract

Isolation and identification of 9- β -D-ribofuranosyl-6-aminopurine from the flowers of *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* M. Gilbert

Purification by successive chromatographic techniques column (CC) and thin layer (TLC) of the butanol phase of the hydromethanol extract of the flowers of *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* enabled the isolation and the identification of 9- β -D-ribofuranosyl-6-aminopurine (adenosine). The structure of this compound was elucidated on the basis of spectroscopic methods (ESI-MS, 1D NMR, and 2D NMR).

Keywords : adenosine, butanol phase, flowers, *Vernonia galamensis*.

1. Introduction

Vernonia galamensis est une espèce oléagineuse, divisée en six sous-espèces (*nairobensis*, *gibbosa*, *lushotoensis*, *afromontana*, *mutomonensis* et *galamensis*) [1]. La sous-espèce *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* est largement distribuée, avec quatre variétés botaniques (*galamensis*, *petitiana*, *australis* et *ethiopica*) séparées géographiquement ou écologiquement [1]. De nombreux travaux ont montré d'une part

l'intérêt de *Vernonia galamensis*, dans l'activité anti-inflammatoire, sédative, analgésique, anti-ulcérogène, antipyrétique et d'autre part dans le traitement des maladies de la peau [2 - 4]. La seule variété présente en Afrique de l'Ouest, *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* est connue pour ses propriétés antidiabétique et insecticide [5, 6]. Cette étude phytochimique est consacrée à l'isolement et à la détermination structurale de composés provenant de la phase de butanol de l'extrait hydrométhanolique des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis*. En effet la phase chloroformique a fait l'objet d'une publication, qui a mis en évidence la 3-O-méthyl quercétine [7]. Le fractionnement de la phase de butanol par les techniques chromatographiques sur colonne de gel de silice et sur couche mince, a permis l'isolement d'un nucléoside. Sa structure a été établie par la combinaison des techniques de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire 1D (^1H et ^{13}C), 2D (COSY et HMQC) et de spectroscopie de masse (ESI-MS) en mode positif comme étant l'adénosine ou la 9- β -D-ribofuranosyl-6-aminopurine. Il s'agit d'un ribonucléoside présentant un large spectre d'activités biologiques rapportées dans la littérature et signalé pour la première fois dans le genre *Vernonia* [8].

2. Méthodologie

2-1. Matériel

2-1-1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis*, récoltées à Bamako (dans la cour de la F.S.T) en Septembre 2011. Après séchage, les échantillons ont été broyés pour disposer de 1Kg de poudre fine.

2-1-2. Appareillage

Colonnes ; silice (230 - 400 Mesh) ; plaques CCM analytiques et préparatives (GF 254); banc Kofler ; pour l'ensemble de nos expériences RMN (1D et 2D), les analyses ont été effectuées sur un spectromètre Bruker Avance III sous un champ de 500 MHz pour ^1H et 125 MHz pour ^{13}C et le spectre de masse a été enregistré à l'aide d'un spectromètre Bruker à quadripôle sous électrospray et en mode positif.

2-2. Screening phytochimique

Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent de révéler la présence de différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes, les hétérosides cardiotoniques, les huiles essentielles, les sucres réducteurs (oses-holosides et mucilages) [9].

2-3. Extraction, purification et isolement du composé B

Le *Schéma 1* ci-dessous, résume le processus d'extraction, de purification et d'isolement du composé B.

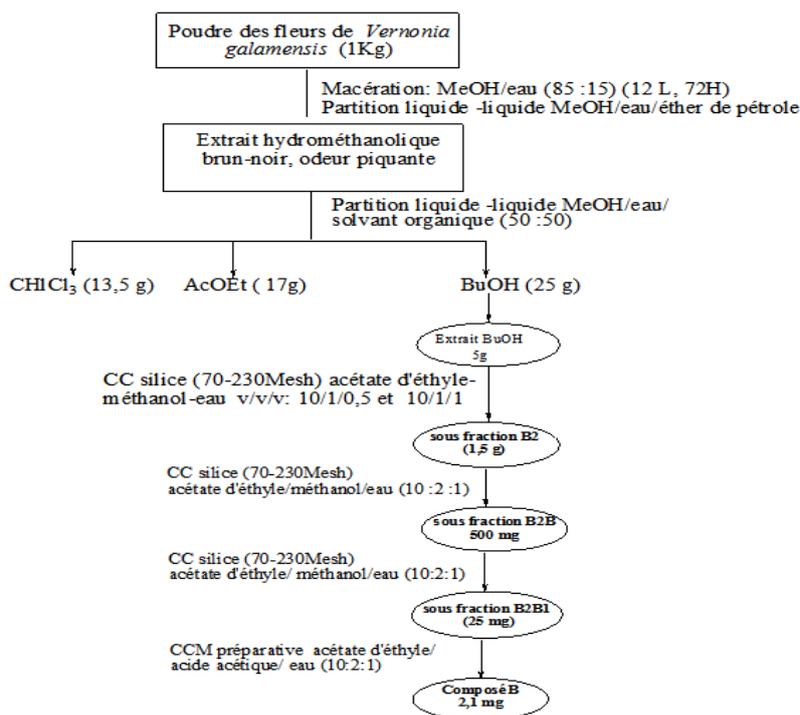
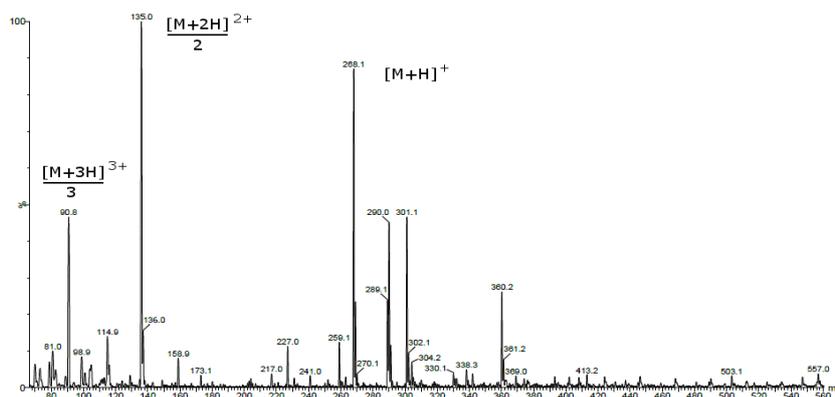


Schéma 1 : Schéma d'extraction, de purification et d'isolement du composé B

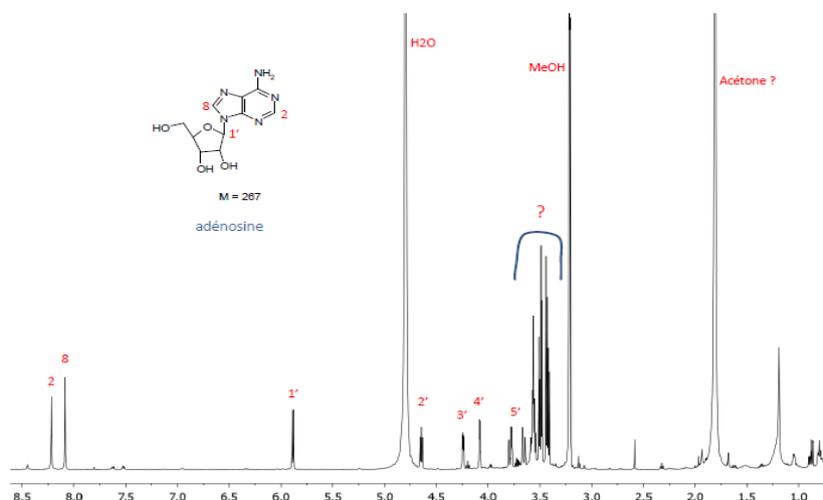
2-4. Elucidation structurale du composé B

Cristaux blanchâtres, $R_f = 0,34$; $T_f : 234\text{ }^\circ\text{C}$. Le spectre de masse ESI en mode positif (*Spectre 1*), montre un ion quasi-moléculaire $m/z 268 [M + H]^+$, ainsi que les ions multichargés $2 + (m/z 135)$ et $3 + (m/z 90)$ suggérant une masse atomique de $267\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



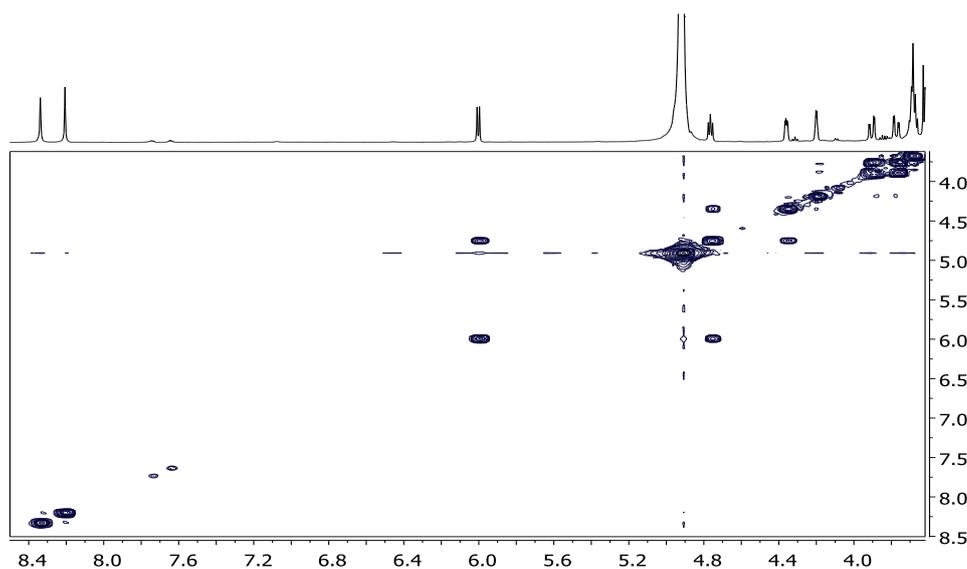
Spectre 1 : Spectre de masse (ESI-SM) en mode positif du composé B

Le spectre RMN- ^1H du composé B (*Spectre 2*) contient sept (7) signaux parmi lesquels deux (2) singulets aromatiques à $\delta\text{H} = 8,20$ et $8,34$ ppm, attribuables aux méthines (C-2 et C-8) par le spectre de corrélation hétéronucléaire à courte distance $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMQC, c'est deux signaux sont cohérents avec ceux de l'adénine [10, 11]. Cinq autres signaux sont présents sur le spectre de RMN- ^1H et correspondent sans doute aux protons de la partie osidique indiquant la présence d'un pentose (*Tableau 1*).



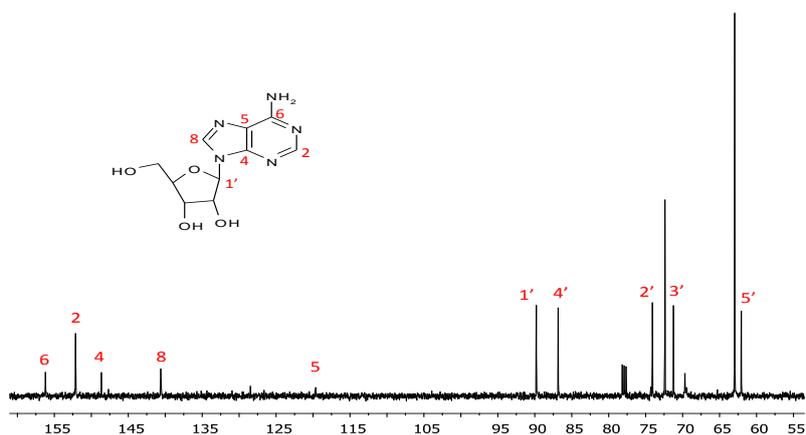
Spectre 2 : Spectre RMN-¹H du composé B dans CD₃OD

Ces observations sont confirmées par le spectre de corrélation homonucléaire ¹H-¹H COSY (*Spectre 3*) qui met en évidence la présence de deux sous-structures dans le composé B2, l'une aromatique, et l'autre osidique. Ce spectre COSY nous permet à partir des couplages successifs de définir le sucre comme étant le ribose. Ces déplacements chimiques sont similaires à ceux de l'adénine β-D-ribofuranoside ou adénosine [10, 11].



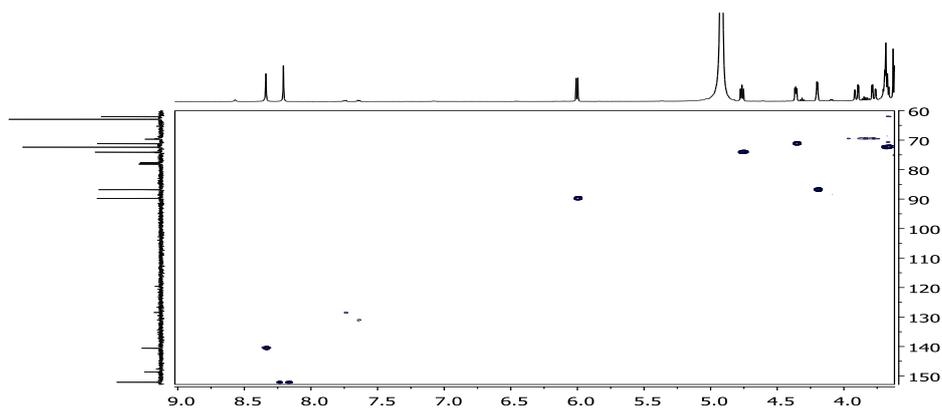
Spectre 3 : Spectre RMN de corrélation homonucléaire ¹H-¹H COSY du composé B montrant les corrélations de la partie osidique caractéristiques du ribose

Le spectre du carbone ¹³C du composé B (*Spectre 4*) révèle la présence de 10 atomes de carbones, dont cinq signaux dans la région des sucres indiquant la présence d'un pentose. Les déplacements RMN-¹³C dans la région des sucres sont caractéristiques, d'un ribofuranose (C-1', C-2', C-3', C-4' et C-5' respectivement à δC 89,64 ; 74,18 ; 71,17 ; 86,24 et 62,14 ppm) (*Tableau 1*). Les cinq autres signaux aromatiques à δC (152,13 ; 148,79 ; 119,77 ; 157,05 ; 139,74) sont en conformité avec une génine de type adénine [10, 11].



Spectre 4 : Spectre RMN-¹³C du composé B dans CD₃OD

Le proton anomère à 6,00 ppm est un doublet ayant une constante de couplage $J = 6,4$ Hz ce qui confère au sucre une configuration β [12]. La forme furanose est confirmée par le déplacement chimique du carbone C-4' (δC 86,24 ppm) [12]. Le spectre de corrélation hétéronucléaire à courte distance ¹H-¹³C HMQC (**Spectre 5**) nous permet de fixer chaque proton à son atome de carbone dans le **Tableau 1** ci-dessous.



Spectre 5 : Principales corrélations HMQC observées pour le composé B

Tableau 1: Spectres RMN¹H (500 MHz), ¹³C (125 MHz) et HMQC de B dans le CD₃OD

N°	δC	δH , mult, J (Hz)	HMQC
2	152,13	8,34 (s)	H-2 / C-2
4	148,79		
5	119,77		
6	157,05		
8	139,74	8,20 (s)	H-8/C-8
arabinose			
1'	89,64	6,00 (d, $J = 6,4$)	H-1' / C-1'
2'	74,18	4,77 (s)	H-2' / C-2'
3'	71,17	4.36 (dd, $J = 4.7 ; 2.2$)	H-3' / C-3'
4'	86,24	4,20 (s)	H-4' / C-4'
5'	62,14	3,90 (dd, $J = 12,3 ; 2,3$)	H-5'α / C-5'
		3,89 (dd, $J = 12,5 ; 2,6$)	H-5'b / C-5'

Toutes les autres valeurs de protons et de carbones ont été attribuées d'après l'analyse des spectres COSY et HMQC, elles concordent avec une structure de type adénine β -D-ribofuranoside. L'ensemble de ces données spectrales, nous a permis l'adénosine des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis*.

3. Résultats et Discussion

3-1. Screening phytochimique

Les résultats du screening phytochimique des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* sont consignés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Screening phytochimique des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis*

Groupes chimiques recherchés	Résultats
composés réducteurs	+
flavonoïdes	+
stéroïls et triterpènes	+
oses et holosides	+
coumarines	+
saponines	+
alcaloïdes	-
tanins	-
hétérosides cardiotoniques	-

+ : présence ; - : absence

3-2. Elucidation structurale

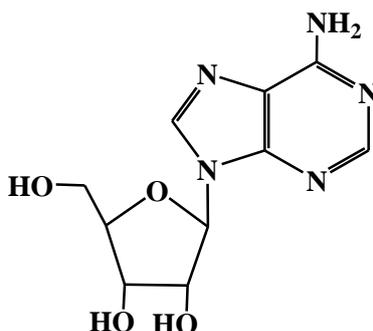


Figure 1 : Structure chimique de l'adénosine ou 9- β -D-ribofuranosyl-6-aminopurine

En guise de discussion, nous notons que le screening phytochimique des fleurs a permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes, de stéroïls et triterpènes, de coumarines, de composés réducteurs, d'oses et holosides dans les fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis*. L'objectif général de ce travail était de contribuer à augmenter la connaissance phytochimique des fleurs de *Vernonia galamensis* Ssp. *galamensis* Var. *galamensis* en caractérisant les produits qui en sont issus en vue de leur valorisation. D'un point de vue chimiotaxonomique, la présence d'un ribonucléoside chez une espèce de *Vernonia*, est surprenante. Au niveau du système respiratoire l'adénosine régule la contraction du muscle lisse bronchique,

augmente la sécrétion de mucus et module l'activité d'un grand nombre de cellules immuno-inflammatoires associées avec certaines maladies pulmonaires inflammatoires [13 - 15]. D'autres effets biologiques importants se manifestent au niveau des vaisseaux (vasodilatation et vasoconstriction), des plaquettes (effet antiagrégant), du rein (inhibition de la libération de rénine et de la réabsorption tubulaire), du cœur (effets inotropique négatif, dromotropique et chronotropique) et du système nerveux autonome (réduction de l'activité des neurones sympathiques et parasympathiques) [13 - 15]. Lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse l'adénosine ralentit la conduction nodale auriculo-ventriculaire, peut interrompre les voies de réentrée à travers le nœud et peut rétablir le rythme sinusal normal chez les patients atteints de tachycardie paroxystique supraventriculaire (TPSV), y compris la TPSV associée au syndrome de Wolff-Parkinson-White [13 - 15]. Dans le système nerveux central, l'adénosine induit un effet analgésique, anti-convulsant, neuroprotecteur, anxiolytique et inhibe l'activité motrice [15, 16]. Cette substance est particulière car les effets qu'elle produit font appel à des mécanismes intracellulaires et extracellulaires [17], elle module l'excitabilité neuronale, régule le flux sanguin, et joue un rôle important dans le contrôle de l'alimentation en énergie du cerveau [18, 19]. Des données suggèrent un rôle pour la signalisation de l'adénosine dans la pathogénie de la drépanocytose [20]. En effet, il est intéressant de noter l'isolement pour la première fois de l'adénosine chez une espèce de la famille des Asteraceae.

4. Conclusion

Ces résultats phytochimiques et les activités biologiques de l'adénosine, ne peuvent qu'encourager les investigations à partir d'autres parties de la plante (racine, feuille) pour rechercher d'autres groupes de composés bioactifs afin d'avoir un profil phytochimique complet de cette variété de *Vernonia galamensis*.

Références

- [1] - R. E. PERDUE, K. D. CARLSON and M. G. GILBERT, *Vernonia galamensis* potential new crop source of epoxy acid. *Econ. Bot*, 40 (1986) 54 - 68.
- [2] - R. K. JOHRI, C. SINGH and B. L. KAUL, *Vernonia lasiopopus* and *Vernonia galamensis*: a medicinal perspective. *Research and Industry*, 40 (1995) 327 - 328.
- [3] - H. M. BURKILL, *The useful plants of West Tropical Africa*, 2nd Edition Royal Botanic Gardens, Kew (K), (1985).
- [4] - P. G. MCCLORY, A. ATKINSON, Use of Naturally Occurring Epoxidised Molecules from *Vernonia galamensis*, US Patent no, US7803409 B2, (2010).
- [5] - M. AUTAMASHIH, A. B. ISAH, T. S. ALLAGH and M. A. IBRAHIM, Critical Diluent-Binder Choice in the Tablet Formulation of the Deliquescent Crude Leaves Extract of *Vernonia galamensis*(Asteraceae). *International Journal of Pharmaceutical Research and Innovation*, 3 (2011) 7 - 13.
- [6] - T. M. BAYE and L. P. A. OYEN, *Vernonia galamensis* (Cass.) Less. [Internet] Fiche de PROTA4U. Van der Vossen, H.A.M. & Mkamilo, G.S. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas, (2007), [http : //www.prota4u.org/search.asp](http://www.prota4u.org/search.asp)
- [7] - A. DOUCOURE, J. GARCIA, D. KONE, A. K. ALIOU and J. N. KÉÏTA, Isolement de la 3-O-méthylquercétine des fleurs de *Vernonia galamensis* (Cass.) Less. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*, 030 (2010) 93 - 102.
- [8] - N. J. TOYANG and R. VERPOORTE, A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 146(3) (2013) 681 - 723.

- [9] - F.N. MUANDA, Identification de polyphenols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques, Thèse de doctorat, Ecole doctorale SESAMES Ecole doctorale SESAMES Ecole doctorale SESAMES, Université Paul Verlaine-Metz, (2010) 93 - 97.
- [10] - L. D. DENISA, H. WEIDONG, D. K. NORBERT, H. MONICA and P. JOSEPH, β -Adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production. *Phytochemistry*, 65 (2004) 181 - 187.
- [11] - S. K. YOUNG, L. IN-KYOUNG, S. SOON-JA, and S. Y. BONG, Chemical Constituents of the Fruiting Bodies of *Clitocybe nebularis* and Their Antifungal Activity. *Mycobiology*, 36(2) (2008) 110 - 113.
- [12] - C. A. PODLASEK, W. A. STRIPE, I. CARMICHAEL, M. SHANG, B. BASU, A. S. SERIANNI, ^{13}C - ^1H spin-coupling constants in the β -D-ribofuranosyl ring : Effect of ring conformation on coupling magnitudes. *J Am Chem Soc*, 118 (1996) 1413 - 1425.
- [13] - E. DE CLERCQ, B. E. DONALD, A. H. JOHN, A. MONTGOMERY, Broad-spectrum antiviral activity of adenosine analogues, *Antiviral Research*, 4(3) (1984) 119 - 133.
- [14] - R. N. GOYAL and A. DHAWAN, Further Investigations into the Oxidation Chemistry of Adenosine - Effect of Applied Potential on the Products Formation. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 1(2006) 304 - 316.
- [15] - C. WOLBER, Caractérisation du mécanisme impliqué dans la bronchoconstriction à l'adénosine potentialisée par une provocation allergique chez le rat «Brown Norway» activement sensibilisé, Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, (2005) 11 - 12.
- [16] - V. T. DUNWIDDIE and S. A. MASINO, The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci*, 24 (2001) 31 - 55.
- [17] - S. BOUDREAU, Etude du rôle de l'adénosine 3''s'-cyclique monophosphate dans l'inhibition de la synthèse des leucotriènes chez le neutrophile humain par l'adénosine, grade de maître ès sciences, faculté des études supérieures, Université de Laval, (1997) 24.
- [18] - M. L. PAJSKI and J. B. VENTON, Adenosine Release Evoked by Short Electrical Stimulations in Striatal Brain Slices Is Primarily Activity Dependent. *ACS Chem. Neurosci*, 1 (2010) 775 - 787.
- [19] - S. PAUL, P. H. ELSINGA, K. ISHIWATA, R. A. DIERCKX and A. VAN WAARDE, Adenosine A1 receptors in the central nervous system : their functions in health and disease, and possible elucidation by PET imaging. *Curr. Med. Chem.*, 18 (2011) 4820 - 4835.
- [20] - J. J. FIELD, D. G. NATHAN, J. LINDEN, The Role of Adenosine Signaling in Sickle Cell Therapeutics. *Hematology-Oncology Clinics of North America*, 28(2) (2014) 287 - 299.