

DISTRIBUTION DES ALCALOIDES DANS LE GENRE *LYCOPODIUM*

J. C. BRAEKMAN,* L. NYEMBO, P. BOURDOUX, N. KAHINDO and
C. HOOTELF*

Service de Chimie Organique. Faculté des Sciences. Université Libre de Bruxelles. Belgique

(Received 5 November 1973)

Key Word Index—*Lycopodium* spp.; Lycopsida; alkaloids; chemotaxonomy.

Abstract—The alkaloid content of *Lycopodium saururus*, *L. carolinianum*, *L. cernuum*, *L. clavatum*, *L. issleri*, *L. sitchense*, *L. carolinum*, *L. contiguum* and *L. thyoides* has been investigated. The results obtained and the distribution of the alkaloids in the genus are discussed from a chemotaxonomic point of view.

INTRODUCTION

LES CINQ genres de l'embranchement des Lycopsida qui sont encore représentés dans la flore vivante sont généralement classés en trois ordres: les lycopodiales (*Lycopodium* et *Phylloglossum*), les sélaginellales (*Selaginella*) et les isoétales (*Isoëtes* et *Stylites*).

Cette classification et l'agencement interne de ces ordres sont cependant sujet à de nombreuses controverses. C'est le cas notamment de l'ordre des lycopodiales dans lequel certains spécialistes distinguent cinq genres répartis en deux familles:¹ les Urostachyaceae (*Huperzia*) et les Lycopodiaceae (*Lycopodium*, *Lepidotis*, *Diphasium* et *Phylloglossum*). Dans ce contexte, plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude de la distribution des sucres,² des lignines,^{2,3} des flavonoïdes⁴ et des hydrocarbures⁵ chez les Lycopsida. Dans leurs grandes lignes, les résultats présentés sont favorables au maintien d'une distinction entre les trois ordres-lycopodiales, isoétales, sélaginellales-chacun de ceux-ci apparaissant nettement différencié par rapport aux deux autres quant à la nature des substances qu'il renferme. Les lycopodiales se caractérisent par une teneur élevée en sucre et par des lignines dont la composition est du type de celles présentes dans les gymnospermes.² Le sucre principalement synthétisé par les sélaginelles est le tréhalose et l'oxydation de leurs lignines fournit de la syringaldéhyde, de la vanilline et du *p*-hydroxybenzaldéhyde ce qui les rapproche des lignines présentes dans les angiospermes.²

Il existe par contre peu d'arguments biochimiques à l'appui d'une quelconque subdivision parmi les lycopodiales. Nous avons déjà attiré l'attention sur le fait que jusqu'à présent il n'y a que chez les espèces réunies dans le genre *Lycopodium* que l'on a mis en

* Chargé de Recherches du Fonds National de la Recherche Scientifique.

¹ ROTHMALER, W. (1951) *Fedde's repertorium* **54**, 256.

² WHITE, E. and TOWERS, G. H. N. (1967) *Phytochemistry* **6**, 663.

³ TOWERS, G. H. N. and MAASS, W. S. G. (1964) *Phytochemistry* **4**, 57.

⁴ VOIRIN, B. (1972) *Phytochemistry* **11**, 257.

⁵ LYTLE, T. F. and SEVER, J. R. (1973) *Phytochemistry* **12**, 623.

TABLEAU I. LISTE DES ÉCHANTILLONS ANALYSÉS

No. de l'échantillon	Nom de l'espèce	Origine	Année de récolte	% en alcaloïdes
Huperzia				
64	<i>L. saururus</i> Lam. (2)	Sabyinyo-Rwanda	1971	0.25
93	(2)(3)	Quito-Equateur	1971	0.48
120	(2)	Kahuzi-Zaire	1973	0.19
123	(2)	Ruwenzori-Zaire	1973	0.30
Lepidotis				
17	<i>L. cernuum</i> L. (2)(3)	Kipopo-Zaire	1969	0.06
36	(2)	Sumatra	1971	0.06
37	(2)	Abidjan-Côte d'Ivoire	1971	0.06
65	(2)	Winka-Rwanda	1971	0.07
121	(2)	Kahuzi-Zaire	1973	0.07
75	<i>L. carolinianum</i> L. var. <i>affine</i> (Bory) Schelpe (2)	Kinshasa-Zaire	1972	0.33
77	(2)(3)	Biano-Zaire	1972	0.16
107	(2)(3)	Kibambi-Zaire	1972	0.34
111	(2)(3)	Lwanza-Zaire	1972	0.19
Lycopodium (<i>sensu stricto</i>)				
25	<i>L. claratum</i> L. (2)(3)	Galapagos-Equateur	1970	0.25
33	(2)	Winka-Rwanda	1972	0.20
41	(2)	Quito-Equateur	1971	0.25
44	(1)	Ardennes-Belgique	1882	0.21
45	(1)	Ardennes-Belgique	1891	0.17
46	(1)	Ardennes-Belgique	1903	0.20
47	(1)	Ardennes-Belgique	1920	0.42
48	(1)	Ardennes-Belgique	1936	0.32
49	(1)	Ardennes-Belgique	1948	0.37
50	(1)	Ardennes-Belgique	1956	0.16
59	(2)	Nord-Kivu-Zaire	1972	0.20
78	<i>L. clavatum</i> var. <i>inflexum</i> (2)	Biano-Zaire	1972	0.36
82	<i>L. clavatum</i> L. (2)	Dohan-Belgique	1972	0.25
97	(1)	Hondo-Japon	1952	0.23
98	(1)	Mexique	—	0.16
99	(1)	Java	—	0.10
100	(1)	Pérou	1854	0.16
101	(1)	Ouro-Préto-Brésil	—	0.31
102	(1)	Minas-Geraes-Brésil	—	0.15
103	(1)	Vermont-U.S.A.	1935	0.18
92	<i>L. contiguum</i> Klotz (2)	Quito-Equateur	1971	0.37
Diphagladium				
31	<i>L. sitchense</i> Rupr. (2)(3)	Québec-Canada	1971	0.40
32	<i>L. carolinum</i> Lawalree (2)(3)	Kahuzi-Zaire	1972	0.25
40	<i>L. thyoides</i> Humb. & Bonpl. ex Willd. (2)(3)	Quito-Equateur	1971	0.50
56	<i>L. issleri</i> (Rouy) Lawalree (1)	Wasserhuppe-Allemagne	1910	0.14
Selaginella et Isoetes				
20	<i>S. selaginoides</i> (L) Link (4)	Sellrain-Autriche	1970	—
24	<i>S. dregei</i> (Presl) Hieron (4)	Kasenga-Zaire	1970	—
81	<i>I. lacustris</i> L. (4)	Auvergne-France	1972	—

(1) Echantillons provenant de planches d'herbier. (2) Echantillons récoltés sur le terrain. (3) Echantillons dont le contenu en alcaloïdes a été analysé autre par chromatographie en phase gazeuse et chromatographie sur couche mince d'alumine, par isolement et identification des constituants. (4) Absence d'alcaloïdes.

évidence la présence des titerpènes du type serratane⁸ et d'alcaloïdes^{6,7} dérivés de la lysine. Comme il apparaît en outre que ces alcaloïdes-dits 'des *Lycopodium'*-possèdent une grande diversité de structures, nous avons pensé qu'ils pourraient être utilisés pour préciser l'agencement interne du genre *Lycopodium*.

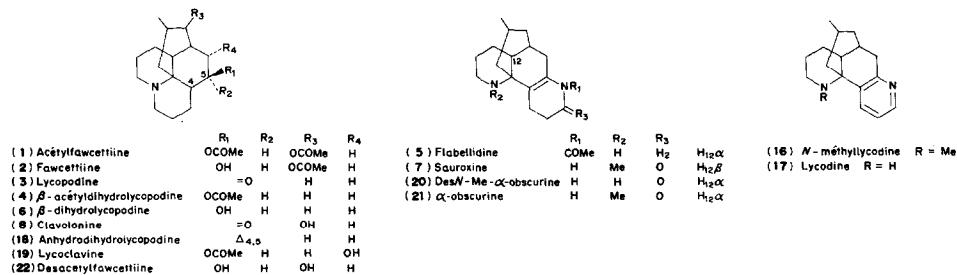
Aussi, notre propos ici sera de présenter des résultats chimiques relatifs à la distribution des alcaloïdes dans plusieurs *Lycopodium*, et de discuter, à la lumière de ces données et de celles déjà publiées, la valeur de ces alcaloïdes en tant que marqueurs d'affinité taxonomique.

RESULTATS

Dans ce travail, neuf espèces différentes de *Lycopodium* ont été examinées et dans la mesure du possible les analyses ont été répétées, pour chacune des espèces, sur des échantillons d'origines diverses et récoltés en des saisons différentes (Tableau 1).

Lycopodium saururus

Le premier travail consacré aux constituants de *L. saururus* a été entrepris par Arata et Canzonerri à la fin du siècle dernier.⁹ Ils y décrivent l'isolement d'un alcaloïde la pillianine, auquel ils ont attribué la formule globale C₁₅H₂₀N₂O. Par la suite, Deulofeu et Delanghe¹⁰ ont repris l'étude de *L. saururus* au départ de matériel végétal d'origine argentine. Deux alcaloïdes ont été isolés sous forme pure: la saururine et la sauroxine. Seule la structure de la sauroxine (7) a été établie, les autres alcaloïdes présents n'ont pas été étudiés.¹¹



Nous avons analysé quatre nouveaux échantillons de *L. saururus* (Echantillons no. 64, 93, 120 et 123). De l'échantillon sud-américain (no. 93) cinq alcaloïdes ont été isolés et identifiés: la lycopodine (3), la clavolonine (8), la fawcettine (2), l'acetyl-fawcettine (1) et, à l'état de traces, la sélaginine (9) (Fig. 1). Nous n'avons pas trouvé de sauroxine, de saururine et de pillianine. Les chromatogrammes obtenus à partir des fractions basiques des trois échantillons africains indiquent que la composition de celles-ci est qualitativement identique à celle de l'échantillon sud-américain (Fig. 2). On y observe cependant une augmentation de l'intensité du pic attribué à la lycopodine (3) par rapport à celle des pics attribuables à la fawcettine (2), à l'acetyl-fawcettine (1) et à la clavolonine (8).

⁶ HEGNAUER, R. (1962) *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Vol. 1, Birkhauser, Basle.

⁷ MCLEAN, D. B. (1968) *The Alkaloids* (MANSKE, R. H. F., ed.), Vol. 10, Academic Press, New York.

⁸ MILLER, N., HOOTELE, C. and BRAEKMAN, J. C. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1759.

⁹ ARATA, P. N. and CANZONERI, F. (1892) *Gazz. Chim. Ital.* **22**, 146.

¹⁰ DEULOFEU, V. and DELANGHE, J. (1942) *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 968.

¹¹ AYER, W. A., HAGBOOD, T. E., DEULOFEU, V. and JULIANI, H. R. (1965) *Tetrahedron* **21**, 2169.

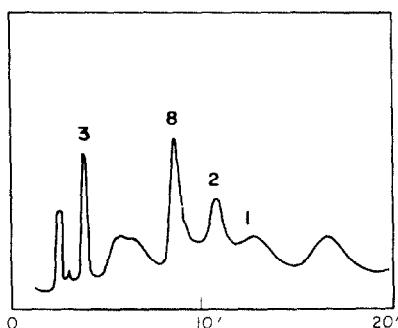


FIG. 1. CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION BASIQUE DE *L. saurus* (ÉCHANTILLON NO. 93).

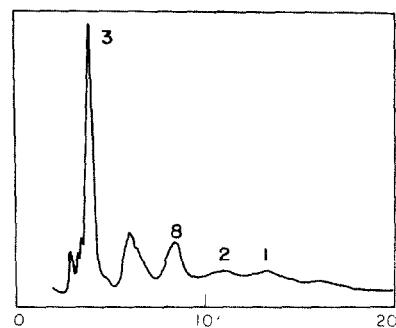
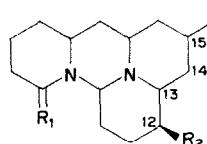


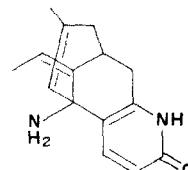
FIG. 2. CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION BASIQUE DE *L. saurus* (ÉCHANTILLON NO. 64).

Lycopodium carolinianum

Dans un précédent travail¹² nous avions mis en évidence dans *L. carolinianum* var. *affine*, la présence de lycocernuine (**10**), d'anhydrolycocernuine (**11**) et d'un alcaloïde nouveau, la carolinianine (**12**) dont nous avons précédemment établi la structure. Quatre nouveaux échantillons de *L. carolinianum* var. *affine*, tous originaires du Zaïre, ont été analysés (échantillons no. 75, 77, 107, 111). Les chromatogrammes obtenus montrent que tous présentent la même composition en alcaloïdes. Une analyse plus fouillée nous a par ailleurs permis d'isoler et d'identifier dans cette espèce outre les trois alcaloïdes déjà cités, la dihydrodesoxycernuine (**13**), la cernuine (**14**) et la dihydrodesoxylycocernuine (**15**). Il est à remarquer que c'est la première fois que l'isolement du dérivé (**15**) à partir d'une source naturelle est mentionné.



	R ₁	R ₂
(10) Lycocernuine	O	OH
(11) Anhydrolycocernuine	O	Δ _{12,13}
(12) Carolinianine	O	OH Δ _{14,15}
(13) Dihydrodesoxycernuine	H ₂	H
(14) Cernuine	O	H
(15) Dihydrodesoxylycocernuine	H ₂	OH



(**9**) Sélagine

Lycopodium cernuum

L. cernuum est une espèce terrestre cosmopolite caractéristique des zones tropicales. En 1967, Ayer et ses collaborateurs^{13,14} ont montré que la lycocernuine (**10**) et la cernuine (**14**) étaient les alcaloïdes majeurs d'un lot de *L. cernuum* originaire des Antilles (Jamaïque); des traces de dihydrodesoxycernuine (**13**) avaient également été détectées.

¹² MILLER, N., HOOTELE, C., BRAEKMAN-DANHEUX, C. and BRAEKMAN, J. C. (1971) *Bull. Soc. Chim. Belges* **80**, 629.

¹³ AYER, W. A., JENKINS, J. K. and VALVERDE-LOPEZ, S. (1967) *Can. J. Chem.* **45**, 433.

¹⁴ AYER, W. A., JENKINS, J. K., PIERS, K. and VALVERDE-LOPEZ, S. (1967) *Can. J. Chem.* **45**, 445.

La lycocernuine (10) et la cernuine (14) sont également les constituants principaux de la fraction basique des échantillons de *L. cernuum* que nous avons examinés (échantillons no. 17, 36, 37, 65, 121). Néanmoins, outre les deux pics attribués aux dérivés (10) et (14), certains chromatogrammes présentent un signal à un temps de rétention similaire à celui de la lycopodine (3) (Fig. 3). La présence effective de cette base a ensuite été confirmée par isolement et comparaison directe avec un échantillon authentique de lycopodine. Ce résultat rejoint celui obtenu récemment par Inubushi et ses collaborateurs qui ont montré la coexistence dans un échantillon japonais de *L. inundatum*¹⁵ d'alcaloïdes du type lycopodane et cernuane. Ces exemples de coexistence au sein d'une même espèce, d'alcaloïdes de squelette différent, obtenus à partir d'un même précurseur—la lysine—sont significatifs de la pluralité des mécanismes biosynthétiques mis en oeuvre pour les synthétiser.

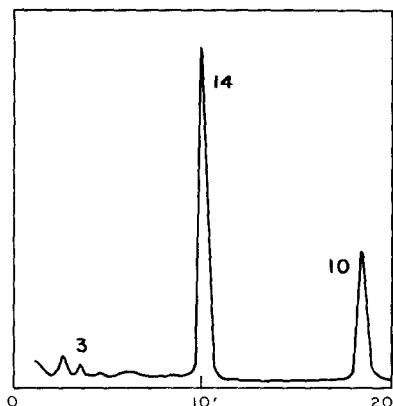


FIG. 3. CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION BASIQUE DE *L. cernuum* (ÉCHANTILLON NO. 36).

Lycopodium clavatum

L. clavatum est une plante cosmopolite dont le contenu en alcaloïdes a déjà été déterminé pour au moins trois échantillons différents collectés en Pologne,¹⁶ au Canada¹⁷ et en Jamaïque,¹⁸ ainsi que pour une variété nord-américaine *L. clavatum* var. *megastachyon*.¹⁹ Alors que pour les deux échantillons nord-américains et l'échantillon européen, on observe comme alcaloïde principal la lycopodine accompagnée de quelques alcaloïdes mineurs,¹⁶⁻¹⁹ l'échantillon antillais présente une composition plus complexe et riche en fawcettiine et désacétylfawcettiine.¹⁸

Il nous a donc paru intéressant d'étendre, dans le cadre d'une étude de la distribution des alcaloïdes dans les lycopodes, cette analyse à un plus grand nombre d'échantillons de

¹⁵ INUBUSHI, Y., HARAYAMA, T., HIBINO, T. and AKATSU, A. (1971) *Yakugaku Zasshi* **91**, 980.

¹⁶ ACKMATOWICZ, C. and UZIEBO, W. (1938) *Roczniki Chem.* **18**, 88.

¹⁷ MARION, L. and MANSKE, R. H. F. (1944) *Can. J. Res.* **B22**, 137.

¹⁸ BURNELL, R. H. and MOOTOO, N. S. (1961) *Can. J. Chem.* **39**, 1090.

¹⁹ AYER, W. A. and LAW, D. A. (1962) *Can. J. Chem.* **40**, 2088.

L. clavatum. Nous avions à notre disposition des lots de cette plante qui avaient séjourné plusieurs années dans les herbiers du Jardin Botanique de Belgique. Dans le but d'établir si le % en alcaloïdes et la nature de ceux-ci n'étaient pas affectés par une conservation prolongée en herbier, nous avons analysé des échantillons de *L. clavatum* récoltés dans les Ardennes belges de 1882 à 1972 (no. 44 à 50 et no. 82). De la comparaison des chromatogrammes obtenus et des pourcentages en alcaloïdes totaux mesurés, il ressort que les alcaloïdes présents dans *L. clavatum* ne sont pas dégradés et que même après 90 ans de conservation en herbier la composition en bases n'est pratiquement pas modifiée.

Ce résultat étant acquis nous avons étendu les analyses aux divers échantillons de *L. clavatum* que nous avions à notre disposition (échantillons no. 25, 33, 41, 59, 78, 97, 98, 99, 100, 101, 102 et 103). L'allure des chromatogrammes obtenus varie en fonction de la provenance des échantillons. En première approximation ceux-ci peuvent être répartis en deux groupes distincts au sein desquels ne s'observent plus que des variations mineures.

Il y a d'une part les chromatogrammes qui présentent un pic important à un temps de rétention correspondant à celui de la lycopodine (3) (Fig. 4), d'autre part ceux qui, outre le pic de la lycopodine, possèdent des signaux à des temps de rétention compatibles avec ceux de la fawcettiine (2) et de ses dérivés acétylé (1) et desacétylé (22) (Fig. 5).

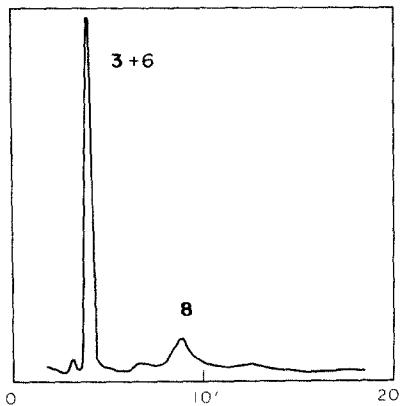


FIG. 4. CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION BASIQUE DE *L. clavatum* (ÉCHANTILLON NO. 82).

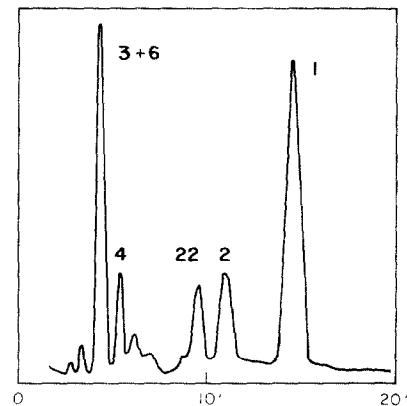


FIG. 5. CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION BASIQUE DE *L. clavatum* (ÉCHANTILLON NO. 41).

Au premier groupe se rattachent les échantillons no. 33, 59, 78, 82, 97, 99 et 103, au second les échantillons no. 25, 41, 98, 100, 101 et 102.

En fait, tout se présente comme si du point de vue de la composition en bases, il existait deux types distincts de *L. clavatum*; l'un cosmopolite et riche en lycopodine, l'autre riche en fawcettiine et ses dérivés, essentiellement localisé en Amérique du Sud.

Par ailleurs, dans le cas de *L. clavatum* et *L. cernuum* des analyses mensuelles ont été effectuées pendant une période d'un an sur des échantillons provenant respectivement des Ardennes belges (échantillon no. 82) et de la station de Kipopo au Zaïre (échantillon no. 17). Aucune variation significative du contenu en alcaloïdes en fonction du temps n'a été observée.

Lycopodium contiguum

L. contiguum est un lycopode sud-américain, morphologiquement très semblable à *L. clavatum*, qui n'avait jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude chimique. L'échantillon analysé (no. 92) est originaire de l'Equateur et sa composition est en tout point identique à celle des échantillons de *L. clavatum* sud-américains.

Nous y avons mis en évidence la présence de lycopodine (3), de β -dihydrolycopodine (6), de β -acétyldihydrolycopodine (4), de fawcettiine (2) et d'acétylfawcettiine (1).

Lycopodium carolinum, *L. issleri*, *L. sitchense* et *L. thyoides*

Les compositions en alcaloïdes de plusieurs lycopodes (*L. complanatum*^{20,21}, *L. tristachyum*^{22,23}, *L. alpinum*²⁴ et *L. sabinaefolium*²⁵) classés actuellement dans le genre *Diphasiump* sont connues (Tableau 2). Ces espèces se caractérisent par une teneur élevée en lycopodine (3) (90–95% du poids des alcaloïdes). Cette particularité qui se retrouve chez trois des nouveaux *Diphasiump* que nous avons analysés: *L. carolinum* (no. 32), *L. sitchense* (no. 31) et *L. issleri* (no. 56) (Tableau 2) n'est cependant pas observée pour l'échantillon de *L. thyoides* sud-américain étudié (no. 40). Cette constatation est à mettre en parallèle avec les différences observées pour *L. clavatum* dont les échantillons sud-américains montrent également des compositions différentes de celles des autres *L. clavatum*.

TABLEAU 2. NATURE DES ALCALOÏDES MIS EN ÉVIDENCE DANS LES LYCOPODES ASSIMILÉS AU GENRE *Diphasiump*

Espèce	Alcaloïde majeur	Alcaloïdes mineurs
<i>L. complanatum</i> L.	Lycopodine (3)	N-Me lycodine (16)
<i>L. tristachyum</i> Pursh.	Lycopodine (3)	Lycodine (17) Anhydrodihydrolycopodine (18)
<i>L. alpinum</i> L.	Lycopodine (3)	Lycoclavine (19) Clavolonine (8) DesN-Me- α -obscurine (20)
<i>L. sabinaefolium</i> Willd.	Lycopodine (3)	—
<i>L. carolinum</i> Lawalree	Lycopodine (3)	β -Dihydrolycopodine (6)
<i>L. issleri</i> (Rouy) Lawalree	Lycopodine (3)	—
<i>L. sitchense</i> Rupr.	Lycopodine (3)	Clavolonine (8) α -obscurine (21)

L'étude de *L. thyoides* a conduit à l'isolement et à l'identification de cinq alcaloïdes: l'acétylfawcettiine (1), la fawcettiine (2), la lycopodine (3), la β -acétyldihydrolycopodine (4) et enfin, à l'état de traces, la flabellidine (5).

Par ailleurs, 3 dérivés entièrement différents ont été isolés; il s'agit des bases "A" (26), "B" (23) et d'un dérivé nouveau, la base "T" (24), stéréoisomère de la base "C", dont la stéréochimie a été établie par des expériences de double irradiation en RMN.

²⁰ AYER, W. A., BEREZOWSKY, J. A. and IVERACH, G. G. (1962) *Tetrahedron* **18**, 567.

²¹ MANSKE, R. H. F. and MARION, L. (1942) *Can. J. Res.* **B20**, 87.

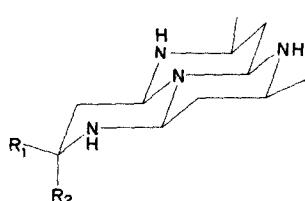
²² MARION, L. and MANSKE, R. H. F. (1944) *Can. J. Res.* **B22**, 1.

²³ CASTILLO, M., GUPTA, R. N., MCLEAN, D. B. and SPENSER, I. D. (1970) *Can. J. Chem.* **48**, 1893.

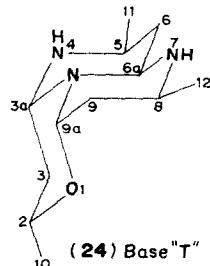
²⁴ MILLER, N., MEES, F. and BRAEKMAN, J. C. (1971) *Phytochemistry* **10**, 1931.

²⁵ MANSKE, R. H. F. and MARION, L. (1946) *Can. J. Res.* **B24**, 63.

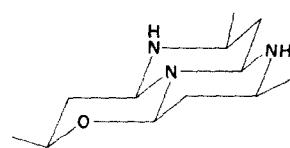
Les bases "A", "B" et "C" sont connues comme produits de condensation de l'ammoniaque sur des composés simples à deux ou quatre atomes de carbone (acétaldéhyde, crotonaldéhyde, . . .).^{28,29}



(23) Base "B" $R_1 = H$; $R_2 = Me$
(26) Base "A" $R_1 = Me$; $R_2 = H$



(24) Base "T"



(25) Base "C"

L'isolement de ce type de dérivés au départ de *L. thyoides* pose le problème de leur origine; il n'est pas établi actuellement s'il s'agit ou non d'artefacts.

DISCUSSION DES RESULTATS

Compte tenu des résultats que nous venons de décrire, il est clair que le genre *Lycopodium* se révèle homogène en ce qui concerne la présence d'alcaloïdes. En effet, tous les échantillons analysés au cours de ce travail et antérieurement à celui-ci contiennent des composés azotés basiques dérivés de la lysine. En cela ils diffèrent nettement des sélaginellales et des isoétales chez lesquels ce type de composé n'a jamais été mis en évidence.⁶ Dans ce sens, nous avons examiné deux sélaginelles—*Selaginella selaginoides* et *S. dregei*—et un isoète—*Isoetes lacustris*—. Dans tous ces cas, le poids de la fraction basique obtenue est extrêmement faible (inférieur à 0,01%) et les tentatives faites pour y mettre en évidence la présence d'alcaloïdes du type de ceux rencontrés chez les lycopodes n'ont pas abouti.

Dans la plupart des lycopodes étudiés, le lieu et l'époque de la récolte n'influencent pratiquement pas le résultat de l'analyse. Pour certaines espèces cependant, des contenus différents en alcaloïdes sont observés. Ainsi par exemple, deux analyses différentes sont décrites pour l'espèce *L. inundatum*: l'une de celles-ci a été réalisée sur un lot de plantes originaires d'Europe occidentale,²⁶ l'autre sur un lot d'origine japonaise.¹⁵ Or il s'avère, après comparaison des planches d'herbier, que les deux lycopodes étudiés sont différents également par leur morphologie. Il y aurait donc lieu, pour résoudre ce problème d'homonymie, de rebaptiser l'une de ces espèces.

Le cas de *L. clavatum* est également complexe. En effet, il existe pour cette espèce largement cosmopolite un grand nombre de variétés morphologiques dûment reconnues. Il n'est dès lors pas étonnant que des variations du contenu en alcaloïdes en fonction de la distribution géographique de l'espèce soient observées. Il n'en reste pas moins que les résultats que nous avons décrits ci-dessus, suggèrent que l'on distingue parmi les lycopodes rassemblés actuellement sous le nom de *L. clavatum* deux espèces chimiquement différentes. Il serait particulièrement intéressant de voir si une telle distinction se justifie également sur la base de données d'ordre anatomique, morphologique et physiologique.

²⁶ BRAEKMAN, J. C., HOOTELÉ, C. and AYER, W. A. (1971) *Bull. Soc. Chim. Belg.* **80**, 83.

²⁷ CASTILLO, M., GUPTA, R. N., HO, Y. K., MCLEAN, D. B. and SPENSER, I. D. (1970) *Can. J. Chem.* **48**, 2911.

²⁸ PACHEL, K. G. R. and PARRISH, J. R. (1968) *J. Chem. Soc. (B)*, 760.

²⁹ GINZEL, W. and KUFFNER, F. (1970) *Monatsh. Chem.* **101**, 1037.

Ainsi que nous l'avons souligné dans l'introduction, l'agencement interne du genre *Lycopodium* est peu précisé et fait l'objet de la part des systématiciens de nombreuses controverses.^{1,4} Du point de vue de leur contenu en alcaloïdes, nous venons de le voir, les lycopodiées se révèlent homogènes puisque toutes possèdent des bases qui dérivent biogénétiquement de la lysine.^{23,27} Par contre, des différences apparaissent lorsque l'on considère les détails de structure des alcaloïdes. Un éventail complet du type de squelette d'alcaloïdes que l'on rencontre dans les lycopodes peut être trouvé dans la Réf. 3. Il est symptomatique de constater que dans de nombreux cas il est possible de regrouper certaines espèces en fonction des caractéristiques chimiques des alcaloïdes qu'elles contiennent et que les groupements ainsi réalisés correspondent à la subdivision des lycopodiées proposée par Rothmaler.¹ Citons à titre d'exemples que: tous les *Diphasium* étudiés, à l'exception d'un échantillon d'origine sud-américaine, se caractérisent par une teneur élevée en lycopodine; il n'y a que parmi les *Lepidotis* que l'on rencontre des alcaloïdes dont le squelette est apparenté à celui de la cernuine; les espèces *L. alopecuroides* et *L. inundatum* (var. européenne) qui sont classées par Rothmaler dans la même série (Genre *Lepidotis*—section *inundata*—série *inundata*) sont les seules espèces à présenter des alcaloïdes pentacycliques du type de l'inundatine. Ces quelques constatations, établies à partir de données fragmentaires (moins de 10% des lycopodes ont été analysés jusqu'à présent), nous paraissent révélatrices de la valeur des alcaloïdes des *Lycopodium*, comme marqueurs d'affinité taxonomique. Celles-ci nous semblent de toute manière suffisamment explicites pour justifier une étude détaillée de la distribution des alcaloïdes dans le genre *Lycopodium*.

Du point de vue de leur contenu en alcaloïdes, les lycopodiées se présentent comme un taxon nettement différencié par rapport à celui des selaginellales et des isoétales. Par ailleurs, les constatations qui ressortent de l'analyse de la distribution des alcaloïdes au sein du genre *Lycopodium* plaident en faveur de l'utilisation de ces alcaloïdes en tant que marqueurs d'affinité taxonomique. Elles viennent aussi à l'appui de la subdivision des lycopodiées effectuée par Rothmaler.

PARTIE EXPERIMENTALE

Le matériel végétal utilisé provient soit de planches d'herbier entreposées au Jardin Botanique de l'Etat et mises aimablement à notre disposition par Lawalree, soit de récoltes effectuées sur le terrain (voir Tableau 1). Les extractions ont été réalisées en utilisant le mode opératoire décrit ci-dessous: Le matériel végétal finement broyé est extrait exhaustivement dans un appareil de Soxhlet par du méthanol. L'extrait obtenu est filtré sur ouate puis évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est repris par une soln aqueuse d'acide acétique à 10%. La suspension obtenue après addition de célite, est filtrée sur verre fritté. Le précipité est lavé plusieurs fois par de l'acide acétique à 10%. Le filtrat est rendu basique par addition d'ammoniaque et extrait exhaustivement par du chloroforme. Les phases chloroformiques sont rassemblées, séchées, et leur volume est ramené à 100 ml par évaporation du solvant en excès, sous pression réduite. Cette phase organique est ensuite extraite exhaustivement par une solnaq. 0.1 M d'acide citrique. Cette nouvelle phase aqueuse acide est également rendue basique par de l'ammoniaque et extraite par du chloroforme. Le résidu solide obtenu est filtré sur une colonne d'alumine (γ -alumine Merck) en utilisant EtOAc/MeOH (9:1) comme éluant. Le résidu solide obtenu après évaporation à sec sous pression réduite du filtrat représente les alcaloïdes totaux. L'analyse de ce mélange est effectuée d'une part par chromatographie sur couche mince (support: plaque d'oxyde d'aluminium Merck F254 neutre (Type E). Elution: une première élution est effectuée sur 5 cm en utilisant EtOAc/MeOH (9:1). Une seconde élution est ensuite réalisée sur 9 cm avec EtOAc), d'autre part par chromatographie en phase gazeuse (Chromatographe Hewlett-Packard modèle 402—Colonne en verre de 4 pieds—phase: 4% OV1 sur DMCS 80/100—Gaz porteur: N₂—flux: 2 ml/sec—Température de la colonne: 185°—Température de l'injecteur: 250°—Température du détecteur: 200°). Les principaux constituants du mélange sont identifiés par comparaison de leurs *R_f* et de leurs temps de rétention avec ceux de substances de référence.

Pour plusieurs échantillons (c.f. Tableau 1) les alcaloïdes ont été isolés à l'état pur, suite à une série de chromatographies sur colonne d'alumine et de distributions à contre courant (système: CHCl₃/tampon MacIlvaine) et identifiés sur la base de leurs propriétés spectrales et par comparaison avec des dérivés authentiques.

Bases "A", "B" et "T" isolées de L. thyoides. Les propriétés spectrales (IR, RMN, SM) des bases "A" (F: 104 105) et "B" (F: 65) sont en parfait accord avec celles décrites dans la littérature.^{28,29} La base "T" cristallise dans l'hexane (F: 101, 5 102). Elle est totalement transparente dans l'UV et se révèle optiquement inactive. Le spectre de masse présente un ion moléculaire à $m/e = 225$ (42) et des ions fragments à $m/e = 224$ (15), 183 (18), 182 (100), 141 (14), 140 (14), 139 (25), 138 (24), 124 (9), 123 (10), 113 (14), 112 (38), 111 (37) et 110 (7). Le spectre de masse relevé à haute résolution établit la composition $C_{12}H_{23}N_3O$ (calculé: 225,1841; observé: 225,1839); le pic de base à 182 u.m. a une composition $C_9H_{16}N_3O$ (calculé: 182,1292; observé: 182,1286). IR (CCl_4): Bandes de 3,100 à 3,500 cm^{-1} (NH). On n'observe pas de bandes de Bohlman. Le spectre de RMN ($CDCl_3$) présente un triplet d'aire 1H à 4,44 ppm (J 3 Hz) (H_{aa}), deux doubles doublets d'aire 2H à 4,13 ppm (J 10,5 Hz) et à 3,94 ppm (J 11 Hz) ($H_{3a} + H_{6a}$), un multiplet d'aire 1H à 3,70 ppm (H_2), un multiplet d'aire 2H à 3,10 ppm ($H_5 + H_8$), un singulet d'aire 2H à 1,70 ppm ($H_4 + H_7$), un doublet d'aire 3H à 1,24 ppm (J 6 Hz) (H_{10}), deux doublets d'aire 3H à 1,11 et 1,02 ppm (J 6 Hz) ($H_{11} + H_{12}$) et un multiplet d'aire 6H s'étendant de 2,1 à 0,7 ppm ($H_3 + H_n + H_9$). L'acétylation à température ambiante de la base "T" par Ac_2O -pyridine (1:1) conduit à un dérivé *N,N*-diacétylé $C_{16}H_{27}N_3O_4$ (M^+ à 309 u.m.); bande carbonyle d'amide à 1625 cm^{-1} en IR ($CHCl_3$); singulet d'aire 6H à 2,12 ppm en RMN ($CDCl_3$).

Remerciements: Nous remercions MM. les professeurs R. H. Martin, J. Pecher et B. Tursch pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail. Plusieurs personnes nous ont aidés pour la récolte et l'identification du matériel végétal, en particulier nous tenons à remercier MM. A. Lawalree et Bamps (Jardin Botanique de l'Utt) et MM. J. Gregoire, F. Malaisse et J. J. Simoens (UNAZA). Notre gratitude va également au Fonds National de la Recherche Scientifique (J.C.B. et C.H.), à l'Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (P.B.) et à l'A.G.C.D. (N.K. et L.N.) pour leur aide morale et financière.