

CARACTÉRISATION DE LA STICTICINE CHEZ LE LICHEN *LOBARIA LAETEVIRENS*

T. BERNARD, M. JOUCLA,* G. GOAS et J. HAMELIN*

Laboratoire de Physiologie végétale, Faculté des Sciences Biologiques et *Groupe de Recherche de Physicochimie structurale, U.E.R. Structure et Propriétés de la Matière, Université de Rennes, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cédex, France

(Reçu le 15 decembre 1979)

Key Word Index—*Lobaria laetevirens*; Stictaceae; lichen; sticticin; methyl 2-trimethylamino-3-(3,4-dihydroxyphenyl) propanoate.

Abstract—Sticticin has been isolated from the thallus of *Lobaria laetevirens*. Its structure was determined by spectroscopic methods (NMR, MS) and comparison with a synthetic sample. It has been found in several species of the Stictaceae.

INTRODUCTION

Certains lichens de la famille des Stictacées dégagent, lorsque leur thalle hydraté est lésé, une odeur désagréable due à une libération de triméthylamine. La formation de triméthylamine est particulièrement importante pour les thalles de *Sticta fuliginosa*, *S. insinuans*, *S. limbata*, *S. sylvatica*, *Lobaria adscripturiens*, *L. amplissima*, *L. discolor* et *L. laetevirens* (Lightf.) Zahlbr. [1, 2].

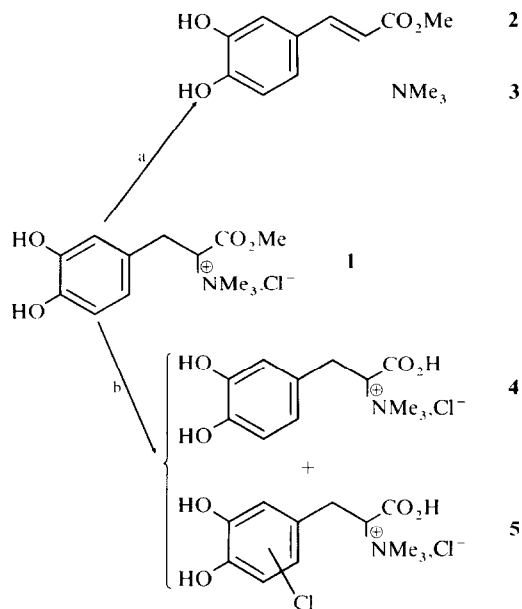
L'infiltration de [méthyle- ^{14}C] L-méthionine et de [2- ^{14}C] glycine dans le thalle de *L. laetevirens* permet de mettre en évidence un composé fortement radio-actif, qui, révélaire par le réactif de Dragendorff, migre à l'électrophorèse vers la cathode et libère de la triméthylamine marquée, par distillation, en présence d'une base forte (KOH, NaOH) [3].

A partir de *L. laetevirens* qui est l'une des Stictacées les plus abondantes en Bretagne, ce composé triméthylammonié a été isolé par électrophorèse à haute tension couplée à des chromatographies sur papier, et recueilli sous forme de chlorure. Sa structure a été déterminée par spectroscopie de masse et de RMN puis confirmée par synthèse univoque; il s'agit du triméthylammonio-2(dihydroxy-3,4-phényl)-3 propanoate de méthyle, ester méthylique de la bétaine de la dihydroxyphénylalanine (DOPA).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le chlorure obtenu est très hygroscopique, très soluble dans l'eau, les alcools et l'acétone, insoluble dans l'éther éthylique et le chloroforme. En solution aqueuse, il se décompose en partie déjà à la température ambiante. Sur les chromatogrammes, après séchage à 50°, il est possible de mettre en évidence l'un des produits de décomposition **2** car il est facilement repérable, même à l'état de traces, par sa forte fluorescence sous un rayonnement UV de 350 nm.

En milieu alcalin même dilué (KOH–NaOH 0,2 N), à la température ambiante, il se transforme immédiatement en acide caféique en libérant de la triméthylamine **3**. En milieu fortement acide (HCl 10,5 N), lorsqu'il est maintenu à la température de 150° pendant 24 hr, il donne plusieurs



Schema 1. Principales étapes de la dégradation de la sticticine par voie chimique: (a) chauffage à 50°, (b) traitement par HCl 10,5 N à 150° pendant 24 hr.

produits dont les mieux représentés sont les composés **4** et **5**. Le composé **4** isolé et traité comme précédemment, se transforme progressivement en composé **5**; celui-ci se révèle stable et semble le terme ultime du traitement par HCl concentré à chaud.

En présence d'un extrait brut du thalle de *L. laetevirens* obtenu en milieu tamponné phosphate de pH 6–6,5, le chlorure libère quantitativement la triméthylamine. Cette libération se fait sous l'action d'une enzyme car elle n'a pas lieu lorsque l'extrait du thalle est préalablement porté à 100° pendant 30 min.

L'analyse spectrale du chlorure conduit aux résultats suivants. Le spectre de RMN, en solution dans l'eau lourde,

effectué à 100 MHz présente les signaux (δ par rapport au TMS): 3,12 ppm (*m*, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{Ar}$); 3,34 (*s*, 9 H, $-\text{N}^+(\text{Me})_3$); 3,67 (*s*, 3 H, $-\text{CO}_2\text{Me}$); 4,43 (*dd*, 1 H, $\text{CH}-\text{CH}_2-$); 6,86 (*m*, 3 H, Ar). Une étude par découplage de spin confirme l'attribution des protons résonnant à 3,12 et 4,43 ppm.

Le spectre de masse réalisé avec une source à ionisation par désorption de champ permet de mettre de évidence l'ion moléculaire M^+ $m/e = 254$ et d'établir la formule brute des ions fragments: $[\text{M}^+\text{Cl}^-\text{HN}(\text{Me})_3]$ $m/e = 349$; $[\text{M}^+, (\text{M}^+ - 60)]$ $m/e = 448$; $[\text{M}^+\text{Cl}^-\text{M}^+]$ $m/e = 543$. Ces fragments résultent d'associations et sont caractéristiques de la technique. Enfin, le pic de $m/e = 194$ ($\text{M}^+ - 60$) correspond à l'ester méthylque de l'acide caféique **2**. Le spectre de masse en ionisation par bombardement électronique permet de déceler le fragment $m/e = 194$, à partir duquel la technique MIKE donne le fragment $m/e = 162$, qui correspond à la perte de MeOH par l'ester.

L'ensemble de ces résultats suggère la formule **1**. Il s'agit donc de l'ester méthylque de la bétaine de la dihydroxyphénylalanine, c'est-à-dire le triméthylammonio-2 (dihydroxy-3,4-phényl)-3 propanoate de méthyle. Nous proposons pour ce composé isolé pour la première fois des Stictacées, le nom plus simple de sticticine.

Cet ester a été préparé au laboratoire à partir de la L-DOPA; les propriétés spectroscopiques, chromatographiques et électrophorétiques du produit de synthèse sont identiques à celles du produit **1** isolé de *L. laetevirens* et confirment l'identification proposée.

Le spectre de RMN du composé **5** en solution dans l'eau lourde présente, par rapport à celui du composé **1** des différences dont une importante au niveau des signaux des protons aromatiques qui ne sont plus qu'un nombre de deux: 2,99 ppm (*m*, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{Ar}$); 3,29 (*s*, 9 H, $-\text{N}(\text{Me})_3$); 4,05 (*dd*, 1 H, $\text{CH}-\text{CH}_2-$); 6,68 (*s*, 1 H, Ar); 6,90 (*s*, 1 H, Ar). Le spectre de masse en désorption de champ donne le pic moléculaire $m/e = 274$. Ce composé est identifié à la bétaine de la dihydroxyphénylalanine dont un H du noyau aromatique (en position 5 ou 6) est substitué par Cl. Les résultats spectroscopiques en RMN permettent d'identifier le composé **4** à la bétaine de la DOPA.

Le traitement en milieu acide de l'ester entraînerait donc, dans un premier temps, l'hydrolyse avec libération de méthanol et, dans un deuxième, la substitution d'1 H par le chlore au niveau du noyau.

Le composé **2** a lui-même été isolé et purifié à partir du thalle de *L. laetevirens*: son spectre de RMN présente les signaux (CD_3CN , δ/TMS): 3,74 (*s*, 3 H, $-\text{CO}_2\text{Me}$); 6,37 (*d*, 1 H, $-\text{CH}=\text{C}$, $J = 16$ Hz); 7,65 (*d*, 1 H, $-\text{CH}=\text{C}$, $J = 16$ Hz). Ces signaux correspondent à ceux du spectre de RMN du caféate de méthyle synthétisé au laboratoire à partir de l'acide caféique. Il est alors possible de donner un schéma de la dégradation de la sticticine par voie chimique (Schema 1).

La détermination quantitative de la sticticine des lichens a été effectuée par dosage, en chromatographie gaz-liquide, de la triméthylamine dégagée par distillation de l'extrait aqueux du thalle en présence d'une base forte [3]. Ce composé n'existe pas chez toutes les Stictacées: *L. pulmonaria*, par exemple, en est dépourvu. Lorsqu'il est présent, il se trouve en quantité relativement importante et peut atteindre 250 μmol par g de matière sèche chez *L. laetevirens*. D'une étude cytologique, il ressort que ce composé est localisé dans le champignon et plus particulièrement dans les vacuoles des hyphes [4]. Le lichen possède une enzyme capable de détacher la

triméthylamine, mais comme celle-ci n'est jamais exhalée par le thalle intact, on peut penser que l'enzyme et son substrat se trouvent localisés dans deux compartiments différents. Le rôle de la sticticine reste à déterminer: chez les lichens qui se déshydratent parfois de façon importante, il pourrait intervenir dans l'osmorégulation.

Le caféate de méthyle se retrouve à l'état de traces avec la triméthylamine dans l'extrait brut de *L. laetevirens*. Mais, il est possible que sa présence soit due à une faible décomposition de la sticticine au cours de l'extraction. Toutefois, le caféate de méthyle a déjà été signalé chez *Scabiosa succisa* [5], *Plantago major* [6], *Vernonia noveboracensis* [7], *Tanacetum odessanum* [8], *Bedfordia salicina* [9], *Gochnatia rushyana* [10] et chez quelques espèces d'*Anthoceros* [11].

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Extraction et purification. L'extraction est réalisée à froid (4°) à partir de thalles frais, de thalles desséchés sur chlorure de calcium ou de thalles lyophilisés; les milieux d'extraction les plus utilisés sont: EtOH 80° acidifié par HCl (0,01 N), TCA à 10% et le mélange MeOH- CHCl_3 - H_2O (12:5:3). Les extraits bruts, concentrés sous vide partiel à 30°, sont repris dans l'eau distillée. Ils subissent une électrophorèse préparative à haute tension (40 V/cm, 1 hr) sur papier Whatman 3 MM imbibé du tampon $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-\text{HOAc}-\text{H}_2\text{O}$ (10:4:986) de pH 5,3 ou de HCOOH 0,75 N de pH 2,0.

Les électrophorégrammes sont séchés dans un four ventilé (40°, 2 hr). Les bandes contenant le composé triméthylammonié, localisé au moyen de rayons UV (forte absorption à 254 nm) et du réactif de Dragendorff, sont découpées puis fixées, par couture, sur une feuille de papier Whatman 3 MM. Ensuite, une chromatographie descendante est réalisée dans le solvant *n*-BuOH-HOAc- H_2O (12:3:5). Après séchage du chromatogramme (40°, 14 hr), le produit localisé de la même façon que précédemment est élué par une soln d'HCl 0,01 N. L'éluat chlorhydrique, évaporé à sec à 30°, est repris par 1 ml d'eau distillée: cette soln aq. subit une nouvelle électrophorèse dans HCOOH, 0,75 N de pH 2,0. La sticticine est définitivement éluée du papier à l'aide de HCl 0,01 N. La soln obtenue, évaporée à sec, puis reprise par l'eau bidistillée ($\times 5$) est évaporée de façon à éliminer HCl en excès. Enfin, le résidu solide, repris par 2 ml d'eau bidistillée, est transvasé dans une ampoule qui sera scellée sous vide après lyophilisation. A partir de 5 g de thalle sec de *L. laetevirens* on recueille 40-50 mg de sticticine sous forme de chlorure.

Propriétés électrophorétiques. Les mobilités électrophorétiques (ME) du produit, exprimées par rapport à celles de la choline [12], sont déterminées, à différents pH, sur papier Whatman 3 MM pour une valeur de champ électrique de 40 V/cm environ: pH 2,0 (HCOOH 0,75 N), ME = 0,55; pH 11,3 (NH_4OH 0,2 N), ME = 0,09; pH 3,9 ($\text{HOAc}-\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-\text{H}_2\text{O}$: 25:7,5:967,5), ME = 0,60; pH 5,3 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-\text{HOAc}-\text{H}_2\text{O}$: 10:4:986), ME = 0,51; pH 6,0 ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}-\text{HOAc}-\text{H}_2\text{O}$: 10:1:989), ME = 0,51.

Propriétés chromatographiques. Les R_f calculés après développement des chromatogrammes (papier Whatman 3 MM, 20°) sont les suivants: 0,60 dans *n*-BuOH-HOAc- H_2O (12:3:5); 0,50 dans 2-BuOH-HCOOH- H_2O (15:3:2); 0,94 dans Ph-EtOH- H_2O (15:4:1); 0,99 dans Ph- NH_4OH (200:1). En CCM sur gel de silice G les R_f sont de 0,04 dans CHCl_3 -MeOH- NH_4OH (60:20:1) et de 0,30 dans CHCl_3 -MeOH-HCl (60:20:1).

Révélation. La localisation de la sticticine sur les chromatogrammes ou sur les électrophorégrammes se fait par pulvérisation du révélateur suivi ou non d'une période de chauffage. Réactif de

Dragendorff: tache jaune orangé à 20°; ninhydrine à 0,4% dans *n*-BuOH: tache bleutée à 110°; vert de bromocrésol 0,2% dans EtOH: tache bleue à 20°; FeCl₃ en soln aq.: tache vert foncé à 20°; réactif de Folin: coloration d'un vert clair. Enfin, avant toute pulvérisation, il est possible de repérer avec précision le composé triméthylammonié par son absorption en UV (254 ou 350 nm).

Chromatographie et électrophorèse des dérivés de la sticticine. Sur tous les chromatogrammes ou électrophorégrammes réalisés à partir d'une soln de sticticine, après séchage à une température supérieure à 50°, le caféate de méthyle est facilement repéré grâce à sa forte fluorescence aux rayons UV à 254 et surtout à 350 nm. Il ne migre pratiquement pas en électrophorèse et ceci quel que soit le pH. En chromatographie, son *R_f* dans *n*-BuOH-HOAc-H₂O (12:3:5) est de 0,87, il ne peut être révélé que par FeCl₃, réactif des phénols, qui donne une tache vert foncé comme pour la sticticine.

Les bétaines **4** et **5** résultant de l'hydrolyse de **1** dans HCl 10,5 N à 150° montrent en électrophorèse dans HCOOH un ME (par rapport à la choline) de 0,27 et en chromatographie dans *n*-BuOH-HOAc-H₂O (12:3:5) un *R_f* de 0,36 pour **4** et de 0,46 pour **5**. Toutes les deux sont mises en évidence par les révélateurs de la sticticine. Elles libèrent de la triméthylamine lorsqu'elles sont traitées par une base forte.

La triméthylamine est identifiée par son odeur caractéristique, sa couleur après traitement au réactif de Dragendorff et par son temps de rétention en CGL à catharomètre.

Essai de synthèse de la sticticine. On prépare d'abord le chlorhydrate de l'ester de la DOPA selon [13]. On agite pendant 4 hr 497 mg (2×10^{-3} mol) de ce produit en soln dans 5 ml de MeOH anhydre avec un grand excès de MeI (2 g) en présence de 100 mg Ag₂O [14]. Après centrifugation et filtration, la soln est évaporée à sec. Le spectre de RMN du mélange brut montre 40% du produit de départ et 10% de sticticine. Des essais effectués pour améliorer le rendement se sont révélés négatifs. Néanmoins, une faible quantité (15 mg) de sticticine de synthèse a pu être isolée, purifiée par électrophorèse et chromatographie puis analysée.

Préparation de l'ester du caféate de méthyle. On dissout 1 g d'acide caféique dans 20 ml de MeOH pur saturé d'HCl [13]. On porte le mélange à reflux pendant 1 hr et on évapore à sec, on répète l'opération puis on recristallise le produit dans le mélange EtOH-Et₂O; F = 245°.

Remerciements—M. P. Guenot, Ingénieur chimiste du Centre Régional des Mesures Physiques de l'Ouest a enregistré les spectres de masses sous bombardement électronique; nous le remercions très vivement de l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Nous remercions également M. P. Hervochon pour son assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bernard, T. et Goas, G. (1968) *C. R. Acad. Sci. Sér. D* **267**, 622.
2. Bernard, T. et Goas, M. (1977) *Bryologist* **80**, 354.
3. Almange, J. P. et Bernard, T. (1968) *Bull. Soc. Chim. Fr.* **11**, 4711.
4. Bernard, T., Goas, M. et Maillet, P. L. (1974) *J. Microscop.* **19**, 307.
5. Torssel, K. (1963) *Ark. Kemi* **21**, 93.
6. Pailer, M. et Haschke-Hofmeister, E. (1969) *Planta Med.* **17**, 139.
7. Bohlmann, F., Brindopke, G. et Rastogi, R. C. (1978) *Phytochemistry* **17**, 475.
8. Bohlmann, F. et Knoll, K. H. (1978) *Phytochemistry* **17**, 319.
9. Bohlmann, F. et Ngo Le Van (1978) *Phytochemistry* **17**, 1173.
10. Bohlmann, F. et Zdero, C. (1979) *Phytochemistry* **18**, 95.
11. Mendez, J. et Sanz-Cabanilles, F. (1979) *Phytochemistry* **18**, 1409.
12. Larher, F. et Hamelin, J. (1975) *Phytochemistry* **14**, 205.
13. Vogler, K. et Baumgartner, H. (1952) *Helv. Chim. Acta* **223**, 1716.
14. Heath, H., Lawson, A. et Rimington, C. (1950) *Nature* **166**, 106.