

STRUCTURE D'UNE LACTONE ALLERGISANTE: LE FRULLANOLIDE—I

G. W. PEROLD, J.-C. MULLER et G. OURISSON

Laboratoire associé au CNRS, Institut de Chimie, Université Louis Pasteur,
1 rue Blaise Pascal, 67008 Strasbourg, France

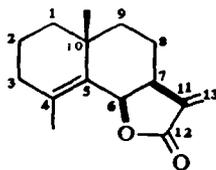
(Received in the UK 23 July 1972; Accepted for publication 14 August 1972)

Résumé— Les Frullaines (Hépatiques, Jungermanniales) sont cause d'allergies. L'extraction de *Frullania tamarisci* a donné la friedeline et, comme seul composé allergisant isolé, une lactone sesquiterpénique: le (–)-frullanolide, dont la structure est établie. L'énantiomère dextrogyre de cette lactone a été isolé de *Frullania dilatata*. Le pouvoir allergisant est intimement lié à la présence du groupement α -méthylène- γ -butyrolactone.

Abstract— *Frullania* spp. (Hepaticae, Jungermanniales) are widespread allergy-inducing epiphytes. Extraction of *Frullania tamarisci* led to isolation of friedelin and of an allergenically active sesquiterpene lactone: (–)-frullanolide, the structure of which has been elucidated. The dextrorotatory enantiomer of this lactone was isolated from *Frullania dilatata*. The allergenic properties observed are linked with the presence of the α -methylene- γ -butyrolactone.

DES ACCIDENTS allergiques classiques en milieu forestier ("dermite du bois de chêne") sont dûs, entre autres, à des plantes sans fleurs, dont les arbres ne sont que le support: les Frullaines. Les Frullaines sont des Hépatiques épiphytes (Bryophytes, Cryptogames vasculaires). Dès 1956, Le Coulant et Lopès¹ s'aperçurent que l'extrait éthéré de *Frullania* permettait l'obtention de réactions cutanées plus rapides et plus intenses, sur des patients sensibles, que celles obtenues avec la plante fraîche. Nous montrons ici que l'allergène responsable de ce type d'accidents cutanés est une α -méthylène γ -butyrolactone sesquiterpénique.

L'extraction à l'éther de diverses espèces de *Frullania*, séchées et broyées, suivie d'un fractionnement chromatographique sur gel de silice, mène à une fraction qui, testée sur un malade sensible, se révèle être très active. Cette fraction, traitée par du benzène fournit des cristaux d'un triterpène, la friedeline (0.05% du poids sec) identifiée par comparaison avec un échantillon authentique. La friedeline n'est pas active sur les malades sensibles. Par distillation sous pression réduite des liqueurs-mères de la friedeline, on isole en premier un produit volatil: $Eb_{0.1} = 85-95^\circ$ (probablement un alcool sesquiterpénique), puis un distillat visqueux:



(–)-frullanolide

1

$Eb_{0.1} = 120-130^\circ$, allergéniquement très actif (1% du poids sec). Par cristallisation dans l'hexane, on obtient une lactone sesquiterpénique nouvelle à laquelle nous avons attribué la structure **1**² et à laquelle nous donnons le nom de *frullanolide*.

La teneur de la plante (en poids sec) en frullanolide peut être estimée à environ 1-3%. Nous avons isolé, selon l'espèce extraite, le (-)-frullanolide **1** ou son antipode le (+)-frullanolide (configurations en 6, 7 et 10 inverses de **1**).

Caractérisation

Le frullanolide, lévogyre ou dextrogyre, est un solide blanc fondant à 77° , au pouvoir rotatoire assez élevé ($[\alpha]_D = \pm 114^\circ$). Sa formule moléculaire, $C_{15}H_{20}O_2$, découle des analyses élémentaires et du spectre de masse ($M^{+} = 232$). Son spectre IR (Fig 1) présente les bandes caractéristiques d'une γ -lactone exométhylénique

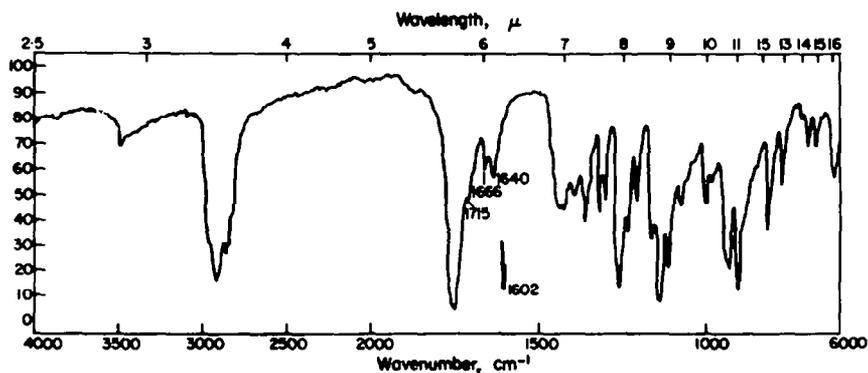


FIG 1

(1757 et 1666 cm^{-1}) et d'une double liaison (1640 cm^{-1}). Son spectre de RMN (Fig 2) confirme la présence du groupe vinylidène (H-13: 2H; $\delta = 6.18$ et 5.60), d'un hydrogène H-6 sur carbone portant un oxygène ($\delta = 5.28$, d, $J = 6\text{ Hz}$), d'un

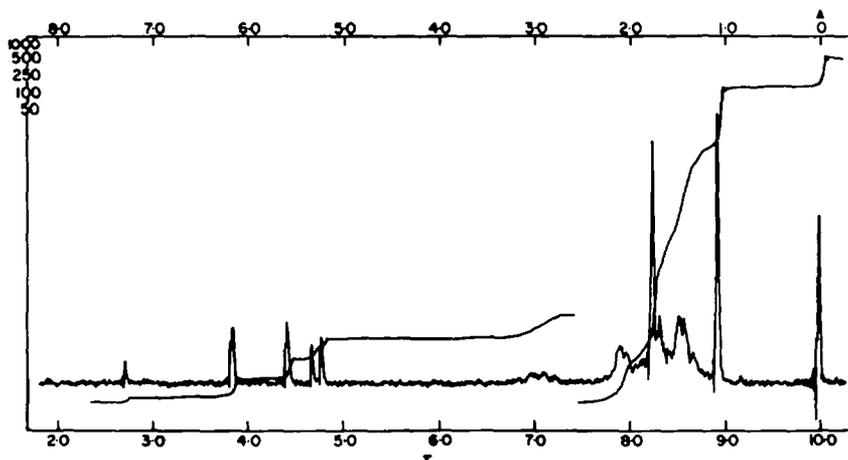
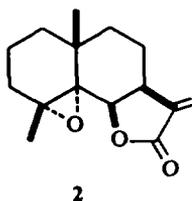


FIG 2

hydrogène allylique H-7 ($\delta = 2.98$, m), de deux autres hydrogènes allyliques H-3 ($\delta = 2.11$, m), d'un méthyle vinylique ($\delta = 1.76$, s) et d'un méthyle tertiaire ($\delta = 1.09$, s).

La présence de la double liaison tétrasubstituée est confirmée par l'obtention de l'époxyde **2** attendu, par traitement par un peracide.



La conformation équatoriale du proton H-6 a pu être déduite des spectres de RMN. En effet, tout comme dans la série de la santonine,³ le proton en H-6, localisé à 5.28 ppm, est un doublet fin ($J = 6$ Hz) et aucun couplage homoallylique entre le proton H-6 et les protons du méthyle en C-4 n'est observé.

Ces indications suggèrent une structure telle que **1**.

Structure

La structure* du (-)-frullanolide, ainsi que l'élucidation de sa configuration absolue, ont été confirmées par une corrélation avec la (6 β , 11 β)-santonine **3**.

La réduction du (-)-frullanolide **1** par NaBH₄ dans EtOAc mène au dihydro-11 (13)-frullanolide **4**†. Une oxydation de ce dihydro-frullanolide par le bichromate de sodium, en présence d'acétate de sodium, permet l'isolement d'une cétone α , β -éthylénique **5** identique (IR, RMN, $[\alpha]_D$, F, F mél.) à la dihydro-1,2-(6 β ,11 β)-santonine, elle même obtenue par hydrogénation catalytique [tris(triphénylphosphine)-chloro-rhodium(I)] de la (6 β ,11 β)-santonine **3**.^{4,5}

Aucun centre d'asymétrie n'ayant été affecté au cours de cette corrélation, la structure du (-)-frullanolide est entièrement prouvée, et la configuration absolue des divers centres d'asymétrie est 6-R, 7S, 10-R.

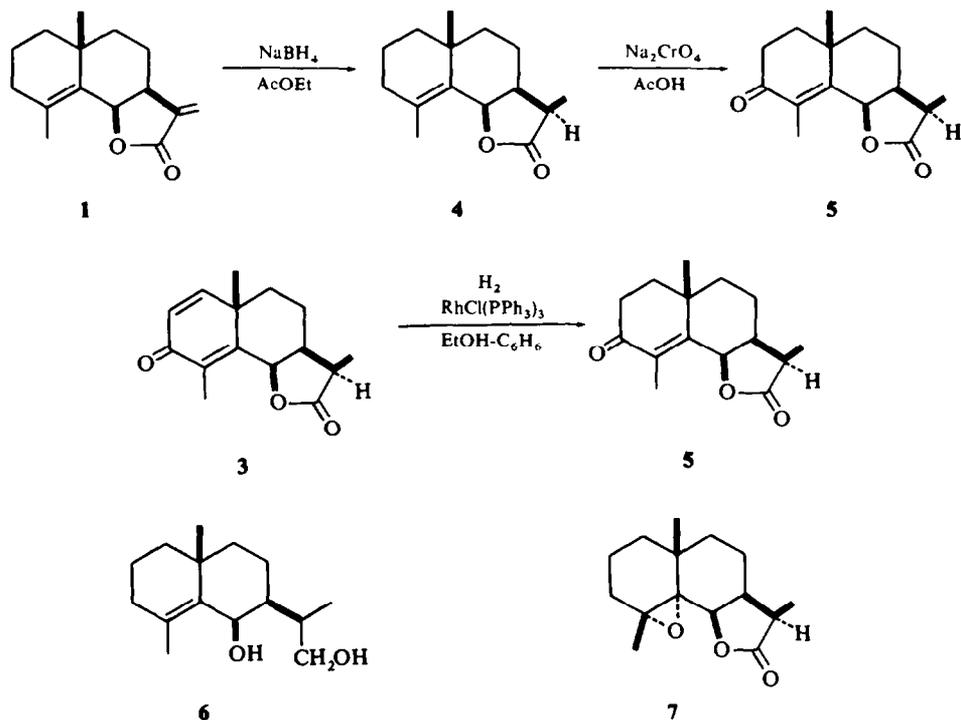
Distribution

Il est très exceptionnel de trouver des sesquiterpènes appartenant aux deux séries énantiomériques, dans la nature, et *a fortiori* dans deux espèces voisines. Il est donc remarquable que, suivant les espèces de Frullaines, l'un ou l'autre des énantiomères du frullanolide **1** ait pu être isolé à l'état pur et de plus que ces deux énantiomères aient le même pouvoir allergénique. En effet, *Frullania tamarisci* (L.) Dum. contient l'énantiomère lévogyre, *Frullania dilatata* (L.) Dum. contient l'énantiomère dextrogyre et un échantillon dans lequel ces deux espèces étaient mélangées (car elles croissent parfois ensemble) mène au racémique.

Le frullanolide a été isolé dans un grand nombre d'espèces de frullaines, particulièrement dans *Frullania tamarisci* (L.) Dum.,⁶ dans *Frullania dilatata* (L.) Dum., et dans *Frullania nisquallensis* Sull.^{7,8}

* Une synthèse du (-)-frullanolide, confirmant cette structure, a été récemment achevée, A. E. Greene, J.-C. Muller et G. Ourisson, *Tetrahedron Letters* 2489 (1972).

† Lors de cette réduction, on isole aussi en faible quantité le diol **6**.



Par contre dans *Frullania atrata* (récolté en Guadeloupe, 1970) et dans *Frullania ecklonii* (récolté en Afrique du Sud, 1970)⁹ le frullanolide n'a pu être décelé; cependant, leurs extraits sont légèrement actifs sur les malades sensibles.

Relation entre l'activité et la structure

Des transformations chimiques du frullanolide montrent que son activité allergisante est intimement liée à la présence de l' α -méthylène- γ -butyrolactone. C'est ainsi que la réduction du groupe $=\text{CH}_2$ en $-\text{CH}_3$ abolit complètement le pouvoir allergisant du produit. Mitchell et collaborateurs,^{7,8} dans une étude portant sur 210 sesquiterpénoïdes dont 132 possèdent groupement 'potentiellement allergisant', constatent que les α -méthylène- γ -butyrolactones sesquiterpéniques sont le dénominateur commun' des dermatoses du bois.

Dans un tout autre domaine, celui des produits agissant sur les tissus tumoraux animaux, l'étude des inhibiteurs d'origine végétale a conduit à la caractérisation d'un certain nombre de lactones sesquiterpéniques. Beaucoup de ces inhibiteurs sont eux aussi des α -méthylène- γ -butyrolactones sesquiterpéniques ayant d'autres groupements fonctionnels (p. ex. la vernolépine, l'éléphantopine et l'eupatundine).¹⁰

Conclusion

L'isolement d'un nouvel eudesmanolide, le frullanolide, à partir d'Hépatiques étend la distribution de cette classe de substances déjà très communes dans certaines espèces de composés.^{11,12} Les Hépatiques, bien qu'étant un groupe botanique

assez vaste, ont été peu étudiées chimiquement. Des sesquiterpènes aux squelettes très variés ont cependant été isolés à partir de diverses espèces. C'est ainsi que dans *Frullania tamarisci*, à côté du frullanolide, l'arbusculine-B (γ -cyclocostunolide) a été isolée,⁶ et dans *Scapania undulata* (L.) Dum. le (-) longifolène et le (-) longibornéol ont été isolés.¹³ On retrouve donc dans cette famille la très grande variété de production de polyterpènes qui caractérise l'ensemble du règne végétal.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres IR ont été mesurés avec un spectrophotomètre Beckman IR-8. Nous indiquons la position des bandes fonctionnelles. Les spectres UV ont été mesurés avec un spectrophotomètre Beckman DK-2 dans EtOH pour spectroscopie. Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un appareil Varian A-60 à 60 MHz et sauf indications contraires dans CDCl_3 . Les spectres de masse (SM) ont été enregistrés sur un spectrographe Thompson-Houston THN 208 avec une tension d'accélération de 70 eV, la température de la source étant comprise entre 150 et 200°. Les pouvoirs rotatoires $[\alpha]_D$ ont été mesurés dans la raie D du sodium (589 nm) dans du chloroforme sur un polarimètre Perkin-Elmer 141. Les points de fusion (F) ont été mesurés au microscope à platine chauffante Reichert. Le déroulement des réactions a été contrôlé à l'aide de chromatoplaques analytiques Merck F₂₅₄ (0.25 mm). Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été effectuées sur un appareil Varian 1200 à ionisation de flamme. Le gaz vecteur est l'azote. Les colonnes utilisées sont en cuivre de 8 mm de diamètre intérieur.

SE-30 (5%) 1.5 m Gas-chrom Q 100-120 Mesh

OV-101 (3%) 2 m Gas-chrom Q 100-120 Mesh.

Les analyses (C, H) ont été effectuées par la Division de Strasbourg du Service Central de Microanalyse du CNRS, sur tous les produits décrits ici, elles coïncident dans tous les cas à 0.1% près au plus avec les valeurs calculées pour les formules moléculaires indiquées.

Les *patch-tests* ont été effectués à la Consultation d'Allergologie de Strasbourg (Dr. J. Fousseureau). L'allergène est disposé en solution dans l'alcool (1%) sur le dos. La lecture du test se fait à la 48ème heure. Un contrôle au quatrième jour est indispensable. Le test est considéré comme négatif (0) dans le cas où la peau garde son apparence normale. L'effet allergique est caractérisé par une rougeur, une démangeaison, des vésicules plus ou moins importantes, allant jusqu'à une réaction fortement oedémique et même bulleuse.

Un échantillon de *Frullania tamarisci* récolté dans les Vosges (Octobre 1968) est séché à l'air. Ce matériel (203 g) est extrait en Soxhlet par de l'éther pendant 91 h, donnant un extrait vert (2.22 g) fortement odorant (odeur de forêt). Cet extrait est chromatographié sur du gel de silice (80 g) et une bande vert-foncée est éluee par le mélange C_6H_6 -EtOAc (9-1). Cette fraction (503 mg) traitée par le C_6H_6 à chaud, cristallise en déposant de fines aiguilles qui, recristallisées dans du C_6H_6 donnent de la frideline F = 256°, identique à un échantillon authentique (IR, RMN, SM, F mélange). Les liqueurs-mères (379 mg) sont distillées sous vide deux fois (tube à boules) pour donner un composé mineur* ayant une odeur de mousse intense; (22 mg; $\text{Eb}_{0.1}$ = 85-95°) et un distillat visqueux (74 mg; $\text{Eb}_{0.1}$ = 120-130°) qui cristallise dans l'hexane, donnant le (-)-frullanolide 1 (23 mg; F = 73-75°).

Cette lactone a été obtenue en plus grande quantité en broyant le résidu de l'extraction à l'éther (200 g) et en extrayant la poudre obtenue au Soxhlet par de l'éther pendant 75 h, on obtient un résidu vert-foncé (4.3 g). Celui-ci est chromatographié sur gel de silice (160 g) et la bande verte éluee et distillée comme précédemment donne un produit cristallisé (1.33 g) qui, après trois recristallisations dans l'hexane, a un point de fusion constant 77° (440 mg).

Le produit pur a donné une réponse positive très intense au test allergénique sur un malade sensible. $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_2$ (232). F: 76.5-77°; $[\alpha]_D = -113^\circ$ ($c = 0.22$, CHCl_3); $R_f = 0.50$ dans le mélange C_6H_6 -AcOEt (24-1); $M^+ = 232$. IR ν_{max} (KBr) 1757, 1715 (épaulement), 1666, 1644. (CCl_4) 1767, 1668, 1645 cm^{-1} . RMN δ (CDCl_3) 6.18 (1H, d, $J = 2$ Hz); 5.60 (1H, d, $J = 2$ Hz); 5.28 (1H, d, $J = 6$ Hz); 2.98 (1H, m, $J = 6$

* Ce constituant odorant chromatographié sur gel de silice (2 g) et redistillé ($\text{Eb}_{0.05}$ = 72-80°) donne une substance chromatographiquement homogène ($R_f = 0.34$ dans C_6H_6); $M^+ = 222$; ν_{max} (liquide): 3460 et 1667 cm^{-1} .

(Hz); 1.76 (3H, s); 1.09 (3H, s) ppm. Un échantillon de *Frullania dilatata*, récolté sur des châtaigniers en gaulis en Dordogne (Avril 1969), extrait, chromatographié et distillé dans les mêmes conditions que précédemment, permet l'isolement du (+)-frullanolide $C_{15}H_{20}O_2$. F: 76–77°; $[\alpha]_D = +114^\circ$ ($c = 0.25$, $CHCl_3$); R_f , SM, IR et RMN identiques à ceux du (–)-frullanolide.

(–) *Epoxyde-4,5-frullanolide 2*. L'époxyde 2 a été obtenu en traitant le (–)-frullanolide (50 mg) par de l'acide *p*-nitroperbenzoïque (80 mg) dans EtOAc (2 ml) pendant 1 h à température ambiante. Le résidu obtenu après évaporation du solvant est directement chromatographié sur gel de silice (5 g). L'époxyde est élué par le mélange C_6H_6 -AcOEt (9–1) et est cristallisé dans le mélange C_6H_6 -hexane (1–1) $C_{15}H_{20}O_3$. F: 143°; $[\alpha]_D = -69^\circ$ ($c = 0.26$, $CHCl_3$); $M^{++} = 248$; IR ν_{max} (KBr) 1757, 1719 (épaulement), 1662 cm^{-1} RMN δ ($CDCl_3$) 6.20 (1H, d, $J = 2$ Hz); 5.67 (1H, d, $J = 2$ Hz); 4.14 (1H, d, $J = 6$ Hz); 1.40 (3H, s); 1.13 (3H, s) ppm. Le (+)-frullanolide a donné, dans la même réaction, l'époxyde antipode. $[\alpha]_D = +70^\circ$ (IR, M^{++} , RMN identiques).

Dihydro-11(13)-frullanolide 4. On traite le (–)-frullanolide 1 (100 mg) par du $NaBH_4$ (51 mg) dans EtOAc (5 ml) pendant 30 min. à température ambiante; on arrête la réaction par AcOH (0.25 ml). Le mélange réactionnel séché est directement chromatographié sur gel de silice (6 g) et le dihydrofrullanolide 4 est élué par le benzène et cristallisé dans l'hexane (64 mg) $C_{15}H_{22}O_2$ (234). F: 68–69°; $M^+ = 234$; IR ν_{max} (KBr) 1758, 1720 (épaulement), 1645 cm^{-1} . RMN δ ($CDCl_3$) 5.21 (1H, d, $J = 4$ Hz); 2.8 (1H, m, $J = 7$ Hz); 1.77 (3H, s); 1.21 (3H, d, $J = 7$ Hz); 1.06 (3H, s) ppm.

L'élué par le mélange C_6H_6 -AcOEt (1–1) permet l'isolement d'un diol 6 $C_{15}H_{26}O_2$ (5 mg) identique à celui obtenu en traitant le dihydro-11(13)-frullanolide 4 par LAH dans l'éther. F: 158–160°; $M^{++} = 238$; IR ν_{max} (KBr) 3360, 1640 cm^{-1} . RMN δ ($CDCl_3$) 4.79 (1H, m); 3.5 (2H, m); 3.26 (1H, m); 1.73 (3H, s); 1.22 (3H, s); 0.97 (3H, d, $J = 7$ Hz) ppm.

Epoxy-4,5-dihydro-11(13)-frullanolide 7. On traite le dihydro-frullanolide 4 (51 mg) par l'acide *p*-nitroperbenzoïque dans EtOAc (2 ml) pendant 1 h à température ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu est chromatographié directement sur gel de silice (5 g). L'époxyde attendu (53 mg) est élué par le mélange C_6H_6 -AcOEt (9–1) et est cristallisé (42 mg) dans le mélange benzène-hexane (1–1). $C_{15}H_{22}O_3$ (250); F: 182–183°; $M^{++} = 250$. IR ν_{max} (KBr) 1770, 1630 cm^{-1} . RMN δ ($CDCl_3$) 4.08 (1H, d, $J = 4$ Hz); 2.7 (1H, m); 1.39 (3H, s); 1.21 (3H, d, $J = 7$ Hz); 1.11 (3H, s) ppm.

Dihydro-1,2(6 β , 11 β)-santonine 5. (a) *Par oxydation allylique du dihydro-frullanolide 4*. Le dihydro-frullanolide 4 (56 mg) est dissous dans une solution NaOAc (58 mg) et de chromate de sodium (116 mg) dans AcOH (1.6 ml) et Ac_2O (1.0 ml). Au bout de 42 h à température ambiante, le mélange réactionnel est additionné d'eau (5 ml) et est extrait par le mélange C_6H_6 - Et_2O (1–1) pour donner un résidu incolore cristallisé (60 mg). Par chromatographie sur gel de silice (5 g) et par élution au mélange C_6H_6 -AcOEt (3–1), on isole une énone-lactone 5 (38 mg) qui cristallise dans le mélange benzène-hexane (1–1). Ce produit est stable lorsqu'il est conservé à l'obscurité, mais est sensible à la lumière solaire diffuse.^{14, 15} Cette énone-lactone a été identifiée à la dihydro-1,2-(6 β , 11 β)-santonine 5 (IR, RMN, SM, F mélange). $C_{15}H_{20}O_3$ (248); F: 148–150°; $[\alpha]_D = -108^\circ$ ($c = 0.22$, $CHCl_3$); $M^+ = 248$; $\lambda_{max}^{E_{OH}} = 245$ nm ($\epsilon = 15,100$) $\Delta\epsilon(MeOH) = +0.15/332$ nm, $-0.43/270$ nm. IR ν_{max} (KBr) 1766, 1661 cm^{-1} . RMN δ ($CDCl_3$) 5.28 (1H, d, $J = 4$ Hz); 2.89 (1H, g, $J = 7$ Hz); 2.69 (1H, d, $J = 4$ Hz); 2.56 (1H, d, $J = 4$ Hz); 1.91 (3H, s); 1.27 (3H, d, $J = 7$ Hz); 1.24 (3H, s) ppm. δ (C_6D_6) 4.82 (1H, d, $J = 4$ Hz); 2.3 (3H, m); 1.93 (3H, s); 1.04 (3H, d, $J = 7$ Hz); 0.96 (3H, s) ppm.

(b) *Par hydrogénation catalytique de la (6 β -11 β)-santonine 3*.^{4, 5} La (6 β , 11 β)-santonine 3 a été aimablement fournie par le Prof. W. Cocker (Université de Dublin). Un échantillon a été recristallisé à partir du mélange benzène-butanone. F: 192–193°; RMN δ ($CDCl_3$) 6.75 (1H, d, $J = 10$ Hz); 6.19 (1H, d, $J = 10$ Hz); 5.33 (1H, d, $J = 4$ Hz); 2.94 (1H, m); 2.04 (3H, s); 1.26 (3H, d, $J = 7$ Hz); 1.26 (3H, s) ppm. On hydrogène en présence de tris(triphénylphosphine)-chloro-rhodium (I) (110 mg) une solution de (6 β , 11 β)-santonine 3 (420 mg) dans le mélange C_6H_6 -EtOH (1–1) (20 ml). Après 20 h, la quantité théorique d'hydrogène ayant été absorbée, on évapore les solvants et on filtre le mélange sur gel de silice. Le produit désiré (413 mg) est cristallisé dans le mélange benzène-hexane. F: 148–149°; $[\alpha]_D = -105^\circ$ ($c = 0.24$, $CHCl_3$). IR ν_{max} (KBr) 1768, 1662 cm^{-1} RMN δ ($CDCl_3$) 5.26 (1H, d, $J = 4$ Hz); 2.88 (1H, d, $J = 7$ Hz); 2.68 (1H, d, $J = 4$ Hz); 2.56 (1H, d, $J = 4$ Hz); 1.91 (3H, s); 1.27 (3H, d, $J = 7$ Hz); 1.23 (3H, s) ppm.

Remerciements—Ce travail a été aidé par des subventions de Roure-Bertrand et Justin Dupont (Grasse) et F. Hoffmann-La Roche (Bâle).

Nous remercions Melle A. M. Lambert et Mme N. Ourisson pour l'identification des espèces de *Frullania*, et M. H. Knoche pour un travail exploratoire avant ensuite permis l'étude du frullanolide. G. W. P., en

congé sabbatique de l'Université du Witwatersrand (Johannesburg), remercie le South Africa Council for Scientific and Industrial Research pour une Senior Bursary, et la Direction des Enseignements Supérieurs pour un poste de Professeur Associé.

Enfin, nous sommes redevables au Dr. J. Foussereau (Consultation d'Allergologie, Institut de Dermatologie, Strasbourg) qui nous a suggéré ce travail et l'a rendu possible en organisant le contrôle allergologique de nombreuses fractions et de produits purs.

REFERENCES

- ¹ P. Le Coulant et G. Lopes, *J. Méd. Bordeaux* **133** 245 (1956); P. Le Coulant et G. Lopes, *J. Méd. Bordeaux* **133** 869 (1956)
- ² H. Knoche, G. Ourisson, G. W. Perold, J. Foussereau et J. Maleville, *Science*, **166**, 239 (1969)
- ³ D. H. R. Barton, G. P. Moss et J. A. Whittle, *J. Chem. Soc. (C)* 1813 (1968)
- ⁴ J. J. Sims, V. K. Honwad et L. H. Selman, *Tetrahedron Letters* 87 (1969)
- ⁵ E. Piers et K. F. Cheng, *Can. J. Chem.* **46**, 377 (1968)
- ⁶ J. Connolly, communication personnelle
- ⁷ J. C. Mitchell, B. Fritig, B. Singh et G. H. N. Towers, *J. Invest. Derm.* **54**, 233 (1970)
- ⁸ J. C. Mitchell et G. Dupuis, *Br. J. Derm.* **84**, 139 (1971)
- ⁹ G. W. Perold, communication personnelle et résultats de ce laboratoire
- ¹⁰ S. M. Kupchan, M. A. Eakin et A. M. Thomas, *J. Med. Chem.* **14**, 1147 (1971)
- ¹¹ R. Regnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Birkhäuser Verlag, Basel **3**, p. 463–478 (1964)
- ¹² W. Herz, *Pharmacognosy and Phytochemistry*, Springer Verlag, Heidelberg p. 64 (1971)
- ¹³ S. Huneck et E. Klein, *Phytochemistry* **6**, 383 (1967)
- ¹⁴ G. W. Perold et G. Ourisson, *Tetrahedron Letters* 3871 (1969)
- ¹⁵ A. E. Greene, J. C. Muller et G. Ourisson, *Tetrahedron Letters* 4147 (1971)