

259. Recherches sur la biochimie des champignons inférieurs IX. Synthèse de précurseurs marqués et biosynthèse de la phoenicine et de l'oosporéine

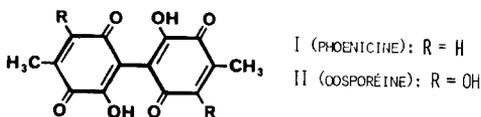
par Eric Steiner, Julius Kalamar, Etienne Charollais et Théodore Posternak

Laboratoires de Chimie Biologique et Organique Spéciale de l'Université de Genève

(29. VIII. 74)

Summary. The biosynthesis of phoenicine and of oosporéine by intact cells of *Penicillium phoeniceum* VAN BEYMA and of *Chaetomium aureum* CHIVERS respectively, has been investigated. Starting from acetic acid, biosynthetic sequences have been proposed; they are based on the incorporation of radioactivity into the two pigments of labelled, biochemically probable precursors. Orsellinic acid appears as a common intermediate, which is converted by multistep processes to 2,3,5-trihydroxytoluene or to 2,3,5,6-tetrahydroxytoluene. Oxidative coupling of two molecules of the triphenol furnishes the reduced form of phoenicine. Similarly, coupling of two molecules of the tetraphenol gives leuco-oosporéine. Both leuco-derivatives are easily dehydrogenated, under physiological conditions, with formation of the diquinones. Coupling occurs when the monophenyl derivatives contain the required number of OH groups in suitable positions.

Dans l'article précédent [1], nous avons décrit, entre autres, les synthèses chimiques de deux pigments fongiques: la phoenicine et l'oosporéine.



Nos travaux précédents [2] [3] [4] ainsi que ceux d'autres auteurs [5] [6] ont montré qu'aussi bien la phoenicine que l'oosporéine sont synthétisées par les microorganismes en utilisant la voie de l'acétate, à l'exclusion de toute autre (mévalonate ou shikimate). Le premier intermédiaire certain est l'acide (*o*-orsellinique (III), isolé de nombreux microorganismes. Parmi ces derniers, nous avons choisi *Penicillium phoeniceum* VAN BEYMA pour l'étude de la biosynthèse de la phoenicine (I) et *Chaetomium aureum* CHIVERS pour celle de l'oosporéine (II).

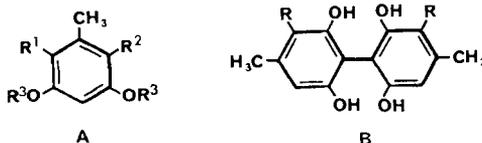
Nous avons déjà étudié en détail [4] le rôle joué dans ces biosynthèses par le trihydroxy-2,3,5-toluène (IV), polyphénol décelé chez d'autres microorganismes, en particulier *Aspergillus fumigatus* et *Penicillium spinulosum* [7] [8]. Le but de ce travail était d'établir de manière plus précise la nature et la séquence des intermédiaires.

Comme précurseurs nouveaux possibles, nous pouvons envisager:

1) le tétrahydroxy-2,3,5,6-toluène (V) ou la quinone correspondante. Ces substances ont été mises en évidence dans des cultures d'*Aspergillus fumigatus* FRESENIUS LSHTM (souche A 46) [7] [9] [10] et isolées comme produit de dégradation de diverses actinomycines [11].

2) l'acide hydroxy-3-(*o*-)orsellinique (VI) qui n'a pas été trouvé à l'état libre, mais seulement comme constituant d'un tridepside, l'acide hiascinique, isolé d'un lichen: *Cetraria hiascens* [12].

3) le tétrahydroxy-3,3',5,5'-bitolyle-4,4' (XII) et l'acide dicarboxylique correspondant XIII, substances qui, à notre connaissance, n'ont pas été découvertes dans la nature. Le produit XIII est nouveau.



Dérivés du type A

III (acide orsellinique): $R^1 = R^3 = H$; $R^2 = COOH$

IV (trihydroxytoluène): $R^1 = R^3 = H$; $R^2 = OH$

V (tétrahydroxytoluène): $R^1 = R^2 = OH$; $R^3 = H$

VI (acide hydroxyorsellinique): $R^1 = OH$; $R^2 = COOH$; $R^3 = H$

VII (triméthoxytoluène): $R^1 = H$; $R^2 = OCH_3$; $R^3 = CH_3$

VIII (triméthoxy-3,4,6-méthyl-2-benzaldéhyde): $R^1 = OCH_3$; $R^2 = CHO$; $R^3 = CH_3$

IX (ac. triméthoxy-3,4,6-méthyl-2-benzoïque): $R^1 = OCH_3$; $R^2 = COOH$; $R^3 = CH_3$

X (tétraméthoxytoluène): $R^1 = R^2 = OCH_3$; $R^3 = CH_3$

XI (Aldéhyde orsellinique): $R^1 = R^3 = H$; $R^2 = CHO$

Dérivés du type B

XII (tétrahydroxybitolyle): $R = H$

XIII (acide tétrahydroxybitolyle-dicarboxylique): $R = COOH$

Partie expérimentale

Méthodes et appareillage. Les méthodes et appareils employés sont les mêmes que dans la communication précédente [1]. Ajoutons que la radioactivité a été mesurée par scintillation liquide au moyen d'un appareil Beckman LS 250. Le «rendement isotopique» indique le pourcentage d'isotope radioactif incorporé dans le précurseur lors de la synthèse chimique. - Les microorganismes proviennent du *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Baarn (NL).

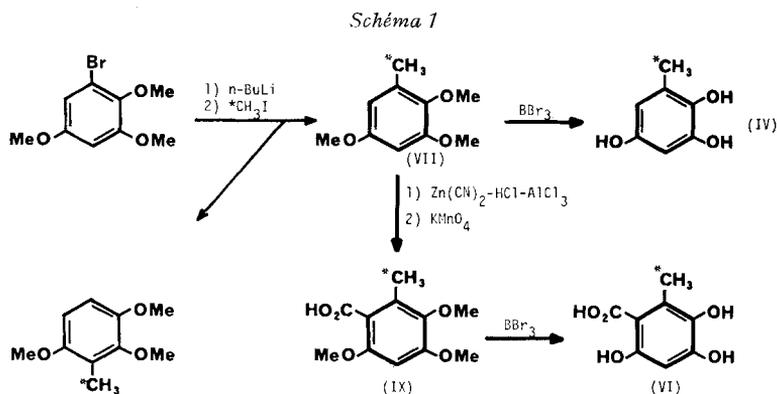
Synthèse de précurseurs marqués. - Le réactif choisi portant l'atome marqué ($^{14}CH_3I$) a été introduit dans les stades ultimes de la synthèse. Les méthodes décrites permettent des synthèses de précurseurs marqués de radioactivité spécifique maximale (jusqu'à 50 Ci/mol).

Dihydroxy-2,5-méthyl-6-p-benzoquinone- $[^{14}CH_3]$. Le **tétraméthoxy-2,3,5,6-toluène (X- $[^{14}CH_3]$)** a été préparé dans les conditions décrites précédemment [1] à partir du tétraméthoxy-1,2,4,5-benzène (2,77 mmol) et de $^{14}CH_3I$ (500 μ Ci). Rendement: 68%; rendement isotopique: 41,3%. Sa déméthylation a été effectuée à l'aide de BBr_3 , 400 mg (1,88 mmol) de X sont traités pendant 48 h par une solution de BBr_3 (2 ml) dans CH_2Cl_2 (6 ml) à température ambiante. Après évaporation, traitement répété au méthanol, puis à l'eau, on neutralise, reprend par du tampon phosphate (0,1M, pH 8,0) et fait passer un courant d'air afin d'oxyder le phénol en **quinone** [9]. La solution rouge-violet est acidifiée (HCl) et extraite à l'éther. Le résidu de la solution étherée est sublimé sous vide (120-130°/10 Torr). On obtient ainsi 167 mg (1,08 mmol, 57,4%), F. 178° (litt. [13]: F. 177°; [14]: F. 184°). Radioactivité spécifique: 265,9 μ Ci/mmol. Rf (syst. 2 [1]): 0,10. - RMN. ($CD_3)_2SO$): δ (CH_3) = 2,83, δ ($H_{arom.}$) = 5,93 ppm. - Cette quinone a été caractérisée comme échantillon non marqué par son **produit d'acétylation réductrice** (poudre de Zn, pyridine, anhydride acétique), F. 193-195° (litt. [15]: F. 198°). - RMN. ($CD_3)_2SO$): δ (CH_3) = 2,01; δ ($OCOCH_3$) = 2,32 et 2,38; δ ($H_{arom.}$) = 7,34 ppm.

De même, le **polyphénol (V- $[^{14}CH_3]$)** a été obtenu et caractérisé après réduction de la quinone par le dithionite. On agite une suspension de quinone dans du dithionite 1M jusqu'à dissolution

et décoloration complète. Après extraction à l'acétate d'éthyle, suivie de l'évaporation, on reprend par le minimum d'éther et précipite le produit V par addition d'éther de pétrole. Le produit ne peut être obtenu analytiquement pur, car il s'oxyde facilement, même à l'état solide. Il a été impossible de l'obtenir incolore. F. 165°. RMN. (CD_3)₂SO: δ (CH_3) = 2,01; δ ($\text{H}_{\text{arom.}}$) = 6,27; δ (OH) \cong 7,40 ppm (pic très étalé, protons échangeables).

Acide hydroxy-3-orsellinique- $^{14}\text{CH}_3$ (VI- $^{14}\text{CH}_3$) et trihydroxy-2,3,5-toluène- $^{14}\text{CH}_3$ (IV- $^{14}\text{CH}_3$). (Schéma 1).



Triméthoxy-2,3,5-toluène- $^{14}\text{CH}_3$ (VII- $^{14}\text{CH}_3$). On traite à température ambiante, en milieu anhydre, 3 g (12,14 mmol) de triméthoxy-2,3,5-bromobenzène [16] en solution dans 5 ml d'éther par un équivalent de butyl-lithium, puis on ajoute, goutte à goutte, $^{14}\text{CH}_3\text{I}$ (0,75 ml, soit 12,05 mmol, 500 μCi) en solution dans 5 ml d'éther. Après une heure, on complète la réaction par addition d'une nouvelle quantité de CH_3I non marqué (12,05 mmol dans 5 ml d'éther). Le mélange réactionnel, traité par 20 ml d'eau, est extrait à l'éther. On obtient ainsi 2 g de produit brut constitué par un mélange de triméthoxy-2,3,5-toluène ($R_f = 0,47$) et de triméthoxy-2,3,6-toluène ($R_f = 0,54$, système 1 [1]). – Par chromatographie préparative [1], on obtient 1,05 g (5,76 mmol) de triméthoxy-2,3,5-toluène- $^{14}\text{CH}_3$ pur, sous forme d'une huile jaune pâle. Rdt. 47,5%. RMN. (CDCl_3): δ (CH_3) = 2,23; δ (OCH_3) = 3,72 et 3,80; δ ($\text{H}_{\text{arom.}}$) = 6,26 et 6,30 ppm.

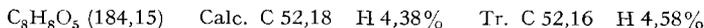
Trihydroxy-2,3,5-toluène- $^{14}\text{CH}_3$ (IV- $^{14}\text{CH}_3$). Dans des conditions anhydres, 100 mg (0,55 mmol) de triméthoxy-2,3,5-toluène- $^{14}\text{CH}_3$ sont traités pendant 24 h à température ambiante, par deux équivalents de BBr_3 en solution à 20% (*v/v*) dans CH_2Cl_2 . Après évaporation à sec, reprise par le méthanol suivie d'évaporation à sec (3 fois), puis par l'eau, on extrait la solution aqueuse, par l'éther en présence de dithionite. Le résidu sec de l'extrait étheré est débarrassé du soufre par lavages répétés avec CS_2 , puis sublimé sous vide ($120^\circ/5 \cdot 10^{-3}$ Torr). On obtient 35 mg (0,25 mmol) de produit presque incolore, ayant les mêmes caractéristiques que celui préparé à partir de la nitroso-orsine [4]. Rdt. 45%. Rdt. isotopique à partir de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$: 19,3%; radioactivité spécifique: 36,7 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$.

Triméthoxy-3,4,6-méthyl-2-benzaldéhyde- $^{14}\text{CH}_3$ (VIII- $^{14}\text{CH}_3$). VII est transformé en aldéhyde par la réaction de Gattermann-Adams, dans les conditions utilisées pour la synthèse de l'acide orsellinique [17]. – 1 g (5,49 mmol) de VII- $^{14}\text{CH}_3$ fournit 1 g (4,76 mmol, 87%) d'aldéhyde brut, assez pur pour être directement oxydé en acide. Par recrystallisation dans l'éthanol absolu, on obtient 950 mg d'aldéhyde pur, F. 103° (litt. [12]: F. 104°).

Acide triméthoxy-3,4,6-méthyl-2-benzoïque- $^{14}\text{CH}_3$ (IX- $^{14}\text{CH}_3$). L'oxydation de l'aldéhyde VIII en acide IX a été effectuée au moyen de KMnO_4 dans l'acétone, selon les conditions décrites pour obtenir l'acide diéthoxycarbonyl-orsellinique [18]. On obtient ainsi 350 mg (1,55 mmol) d'acide brut à partir de 500 mg (2,38 mmol) de VIII- $^{14}\text{CH}_3$. Rdt. 65%. F. de IX purifié: 148–149° (litt. [12]: F. 147–149°).

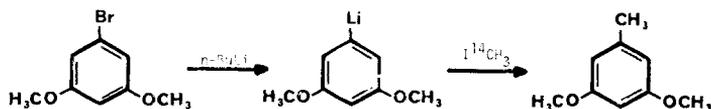
Acide hydroxy-3-orsellinique- $^{14}\text{CH}_3$ (VI- $^{14}\text{CH}_3$). Dans des conditions anhydres, 100 mg (0,44 mmol) de dérivé triméthylé IX- $^{14}\text{CH}_3$ en solution dans 2 ml de CH_2Cl_2 sont traités à

température ambiante, pendant 24 h par 1,5 ml de BBr_3 en solution à 20% (en vol.) dans CH_2Cl_2 . Après évaporation à sec, traitement répété au méthanol, on reprend par l'eau et extrait à l'éther en présence de dithionite. L'extrait étheré laisse un résidu fortement coloré, qui est purifié par chromatographie sur couche épaisse. On obtient environ 8 mg (0,043 mmol, 9,8%). Rdt. isotopique à partir de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$: 3,6%. Contrairement aux indications de la littérature [19], le produit fond à 132° et non à 194°). Radioactivité spécifique: 55,8 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$. – RMN. (CD_3OD): δ (CH_3) = 2,42; δ ($\text{H}_{\text{arom.}}$) = 6,18 ppm (tous les protons échangeables se retrouvent à 4,78 ppm).



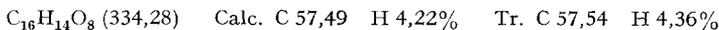
Tétrahydroxy-3,3',5,5'-bitolyle-4,4'-[^{14}C] $_2$ (XII-[^{14}C] $_2$). La méthode de synthèse détaillée figure dans l'article précédent [1], où XII est un intermédiaire dans la préparation de la phœnicine. Nous indiquerons ici seulement une nouvelle synthèse du produit de départ, la di-O-méthyl-orcine-[^{14}C] $_2$, qui a été élaborée selon le schéma 2, afin d'obtenir une incorporation maximum de la radioactivité.

Schéma 2



On traite en solution étherée 5,5 g (25,3 mmol) de diméthoxy-3,5-bromobenzène [20] par 25 mmol de butyl-lithium pendant 1 h à température ambiante. On ajoute 0,5 ml de CH_3I non marqué, puis 1 ml de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$ (2 mCi), puis après 1 h encore 1 ml de CH_3I non marqué. Après traitement par l'eau, extraction à l'éther, le produit est purifié par distillation ($110\text{--}111^\circ/19$ Torr). Rdt. 2 g (13,1 mmol, 52%). Radioactivité spécifique: 48,3 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$; rdt. isotopique: 31,6%. Les constantes physiques (IR., RMN., indice de réfraction, Rf en couche mince) sont identiques à celles de la di-O-méthyl-orcine authentique. On obtient le tétrahydroxybitolyle XII-[^{14}C] $_2$; radioactivité spécifique: 96,6 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, rdt. isotopique: 4,4% à partir de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$.

Acide tétrahydroxy-3,3',5,5'-bitolyle-4,4'-dicarboxylique-2,2'-[^{14}C] $_2$ (XIII-[^{14}C] $_2$). Différentes voies de carboxylation de XII ont été essayées. La seule qui nous ait permis de réaliser cette synthèse est la carboxylation directe au moyen du carbonate de méthylmagnésium (CMM). – 50 mg (0,2 mmol) de XII-[^{14}C] $_2$ et 2 ml d'une solution 2M de CMM dans le diméthylformamide (DMF), préparé selon *Finkbeiner et al.* [21], sont chauffés en tube scellé pendant 4 h à 120° . Le mélange est repris par $\text{HCl} \cdot 6\text{N}$ et extrait à l'éther. La solution étherée est évaporée à sec. Après avoir bien éliminé le DMF (évaporations répétées avec de l'éthanol), on reprend par un peu d'éther et précipite XIII à l'éther de pétrole. On obtient 25 à 30 mg de produit brut qui doit être purifié par chromatographie sur couche épaisse. Rdt.: 17 mg (0,05 mmol, 25%). F. 220° (déc. avec perte de CO_2). – RMN. (CD_3OD): δ (CH_3) = 2,59; δ ($\text{H}_{\text{arom.}}$) = 6,45; δ (OH et COOH) = 5,00 (déplacés par CD_3OD). Rdt. isotopique à partir de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$: 1,1%.



Acide o-orsellinique-[2- ^{14}C] (III-[2- ^{14}C]). L'acide orsellinique utilisé a été marqué sur le noyau en position 2, en utilisant des méthodes déjà décrites: condensation de l'acétylacétate-[3- ^{14}C] d'éthyle et du crotonate d'éthyle [22], passage par l'acide dibromo-orsellinique comme intermédiaire et réduction de ce dernier [23]. L'acide orsellinique (III-[2- ^{14}C]), radioactivité spécifique: 14,2 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ s'obtient avec un rendement global, par rapport à l'acétylacétate d'éthyle, de 8%; le rendement isotopique est du même ordre de grandeur (7%).

Acide orsellinique-[3,5- $^3\text{H}_2$]. 30 mg (0,092 mmol) d'acide dibromo-3,5-orsellinique, dissous dans 2 ml d'éther anhydre, sont traités durant $\frac{1}{2}$ h, à température ambiante, par 1 mmol de butyl-lithium. On introduit ensuite en $\frac{1}{4}$ h, sous bonne agitation, 0,1 ml d'eau tritiée, soit 0,8 mCi. Après acidification par HCl , l'acide orsellinique est extrait à l'éther, purifié par chromatographie et dans l'eau/éthanol. Radioactivité spécifique: 44,27 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$.

¹⁾ Il s'agit peut-être d'un dimorphisme.

Pour obtenir l'acide «doublement marqué», on a dissous dans NaHCO_3 aq. 1m des quantités égales d'acide orsellinique marqué par ^3H et par ^{14}C ; le produit a été ensuite précipité par acidification avec HCl . Radioactivité spécifique: ^3H 21,35 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$; ^{14}C 8,1 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$.

Acétylacétate-[3- ^{14}C] de lithium. Il est préparé par saponification de l'acétylacétate-[3- ^{14}C] d'éthyle par LiOH selon Hall [24].

Phoenicine-[^{14}C]. Elle a été obtenue par culture de *P. phoeniceum* en présence d'acétate marqué (1- ou 2- ^{14}C).

Par décarboxylation de l'acide orsellinique-[2- ^{14}C] [25], on a préparé l'*orcinol*-[3- ^{14}C]; à partir de ce dernier, on a obtenu l'*aldéhyde orsellinique* (XI-[2- ^{14}C]) [17].

Incorporation des précurseurs marqués. – *Conditions de culture des microorganismes.* Tous les essais ont été effectués en cultures non agitées, à la température de $25^\circ (\pm 1^\circ)$, sans aération particulière; le mycélium se développe à la surface d'un milieu d'environ 15 mm d'épaisseur (50 ml de milieu dans un erlenmeyer de 200 ml).

Le milieu utilisé est celui de *Czapek-Dox* acide [26] pour *Penicillium phoeniceum* van Beyma. Nous avons montré précédemment [2] que la teneur de certains ions métalliques est importante pour une production optimale de phoenicine: Fe^{++} : $9 \cdot 10^{-5}\text{M}$; Zn^{++} : $8 \cdot 10^{-7}\text{M}$; Cu^{++} : $3 \cdot 10^{-6}\text{M}$. *Chaetomium aureum* Chivers, producteur d'oosporéine, est incapable d'utiliser le nitrate comme source d'azote unique, et nous avons dû le remplacer dans le milieu *Czapek-Dox* par de la D,L-asparagine; le fer et le zinc sont utilisés aux concentrations indiquées. Par contre, le cuivre n'est pas nécessaire et semble même inhiber la pigmentogénèse à des concentrations supérieures à $3 \cdot 10^{-6}\text{M}$. L'adjonction de pantothénate de calcium (20 mg/l) favorise également la production d'oosporéine. Les compositions comparées des milieux de culture utilisés sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1. Composition des milieux de culture (par l'eau bidist.)

	<i>P. phoeniceum</i>	<i>Ch. aureum</i>		<i>P. phoeniceum</i>	<i>Ch. aureum</i>
D-glucose	50 g	50 g	NaNO_3	2,0 g	0
KH_2PO_4	1,0 g	1,0 g	D,L-asparagine	0	7,0 g
KCl	0,5 g	0,5 g	Zn^{++}	$8 \cdot 10^{-7}\text{M}$	$8 \cdot 10^{-7}\text{M}$
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g	0,5 g	Cu^{++}	$3 \cdot 10^{-6}\text{M}$	0
$\text{FeSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$	0,02 g	0,02 g	Pantothénate de calcium	0	4 mg

Les souches sont conservées sur *Czapek-Dox*/1% agar et *Potato extract*/glucose/agar (4% : 2% : 1%) respectivement pour *P. phoeniceum* et *Ch. aureum*.

Mode d'administration des précurseurs. Les précurseurs sont introduits stérilement dans le milieu de culture dès le début de la production de pigment, soit au bout de 8 à 10 jours pour *P. phoeniceum*, et de 4 à 6 jours pour *Ch. aureum*. Sauf indication contraire (cf. tableaux d'incorporation), le précurseur est administré en une seule fois, afin de défavoriser la biosynthèse d'enzymes induits. Les cultures sont arrêtées une semaine après l'administration du précurseur.

Extraction et purification des pigments. Après filtration des cultures, les mycéliums lavés à l'eau sont séchés et pesés. Pour la phoenicine, la solution est acidifiée à pH 2 et une aliquote est prélevée pour le dosage. Le pigment est extrait au chloroforme [3], puis recristallisé dans l'éthanol absolu. Un échantillon est transformé, en vue de la mesure de la radioactivité, en hexaacétate de leucophoenicine [27], purifié par chromatographie sur couche de silice (système 1 [1]), puis recristallisé dans l'acide acétique. Pour le dosage de l'oosporéine, une aliquote de la solution de culture est prélevée avant l'acidification, car à pH 2 l'oosporéine est très peu soluble et précipite. Il suffit de l'isoler par centrifugation et de la recristalliser dans le dioxanne. La radioactivité est également mesurée sur un échantillon transformé en octa-acétate de leuco-oosporéine [28], purifié par chromatographie sur couche de silice et recristallisé.

Dosage des pigments. Vu le grand excès de phoenicine ou d'oosporéine présent dans le milieu, on peut doser ces pigments avec une bonne approximation par le réactif de Folin des phénols.

1 ml de solution contenant 25 à 80 μg de pigment est additionné de 10 ml de Na_2CO_3 1M et de 1 ml de réactif de *Folin*. Après 15 min à température ambiante, on mesure la densité optique à 766 nm. Dans les limites indiquées, la relation concentration/densité optique est linéaire pour les deux pigments.

Mesure de la radioactivité. Les mesures sont effectuées sur les dérivés acétylés ci-dessus par scintillation liquide, dans le mélange de *Bray* [29]. Les produits sont recristallisés jusqu'à radioactivité constante.

Résultats et discussion

Remarques générales. Jusqu'à présent, nous n'avons pu disposer d'extraits acellulaires de *P. phoeniceum* ou de *Ch. aureum* susceptibles d'effectuer des pigmentogénèses. Nous avons donc dû étudier les biosynthèses des deux pigments au moyen de cellules intactes. Cette technique comporte les sources d'erreur suivantes dont, souvent, on ne tient pas assez compte:

a) Par suite d'un mauvais transport à travers les membranes cellulaires, la radioactivité d'un intermédiaire physiologique sera mal incorporée dans le produit final.

b) En présence de quantités suffisantes d'une substance radioactive qui n'est pas un intermédiaire physiologique, les cellules élaborent, dans certaines conditions (par exemple lorsque le produit est introduit en plusieurs portions), des enzymes induits. L'attaque par ces derniers du nouveau substrat se traduit parfois par une incorporation radioactive dans le produit final.

c) Enonçons enfin une règle qui a été fréquemment confirmée: en présence de préparations acellulaires, il faut s'attendre à une incorporation radioactive d'autant plus forte que l'intermédiaire est plus proche du produit final dans la séquence biosynthétique.

Les tableaux 2 et 4 montrent qu'aucun dérivé du biphenyle ne donne lieu à une incorporation notable. On pourrait en déduire, par exemple, que la perméabilité cellulaire défavorise l'entrée de ces substances en raison de leur poids moléculaire relativement élevé. Si l'on considère, toutefois, des composés de poids moléculaire environ deux fois plus faible, on constate que la radioactivité de certains d'entre eux (orcine, aldéhyde orsellinique, acide hydroxyorsellinique) est très mal incorporée (<2%) dans la phoenicine; d'autres, parmi ces composés, montrent par contre des incorporations considérables (de 6 à 21% dans la phoenicine et de 6 à 35% dans l'oosporéine). Nous verrons par la suite que la règle c) n'est pas respectée, ce qui s'expliquerait évidemment par des variations de perméabilité cellulaire. Ces variations ne sont cependant pas très considérables. Nous admettons alors que les substances produisant de fortes incorporations représentent des intermédiaires physiologiques, à condition, toutefois, que les incorporations ne soient pas augmentées, lorsque l'administration aux cultures a lieu de manière à favoriser la formation d'enzymes d'adaptation. C'est en nous basant sur ces principes que nous proposerons des voies biosynthétiques pour les deux pigments.

On avait observé auparavant que ces biosynthèses ont lieu à partir de l'acide acétique. Utilisant de l'acétate-[1- ^{14}C] ou -[2- ^{14}C], on avait montré, aussi bien dans la phoenicine produite par *P. phoeniceum* [2] [3] que dans l'oosporéine de *Beauveria bassiana* [5] et de *Ch. aureum* [6], une répartition isotopique correspondant à la règle de l'acétate. Conformément à cette règle, l'acétylacétate produit une incorporation de 9,3% dans la phoenicine et, il est vrai, plus faible (3,5%) dans l'oo-

sporéine. L'acide orsellinique (III), formé à partir de 4 molécules d'acétate, donne des incorporations élevées dans les deux pigments: 21 à 36%. Dans le cas de la phoenicine, l'administration du précurseur en 5 portions, c'est-à-dire dans des conditions favorisant l'adaptation, au lieu de l'augmenter, abaisse à 9% l'incorporation, ce qui rend probable l'action de systèmes enzymatiques natifs.

La question se réduit maintenant à celle du mode de conversion de l'acide orsellinique. A un moment donné, il doit se faire un couplage de deux composés mono-phénylés en un dérivé du biphenyle. Vu l'incorporation presque nulle, dans les deux pigments, de la radioactivité de l'acide tétrahydroxybitolyle-dicarboxylique XIII et du tétrahydroxybitolyle XII, on peut exclure un couplage direct de l'acide orsellinique ou de l'orcinoï. D'ailleurs, ce dernier ne donne lieu qu'à une faible incorporation (0,7 à 1,5%) dans la phoenicine, incorporation passant à 3,9% dans des conditions favorisant la production d'enzymes d'adaptation.

Phoenicine (I). Le tableau 2 indique une incorporation très faible (1%) de l'acide hydroxy-orsellinique (VI), ce qui exclut la formation de ce produit par hydroxylation de l'acide orsellinique. On constate, par contre, une assez bonne incorporation de la radioactivité du trihydroxytoluène IV: 8,6%. D'après les critères indiqués

Tableau 2. Incorporation radioactive dans la phoenicine

	Précurseur				Phoenicine			Incorporation dans la phoenicine (%)
	Mode d'introduction	Quant. introd. μmol	Radioactivité spécifique $(\mu\text{Ci}/\text{mmol})$	Radioactivité totale (μCi)	Quantité produite (mg)	Radioactivité spécifique $(\mu\text{Ci}/\text{mmol})$	Radioactivité totale (μCi)	
Acétylacétate de Li	en 1 fois	44	13,9	0,61	197	0,079	0,057	9,3 %
Ac. orsellinique	en 1 fois	29,1	14,2	0,41	169	0,076	0,047	11,5
Ac. orsellinique ¹	en 1 fois	25,8	8,1	0,21	236	0,052	0,045	21,4
Ac. orsellinique	en 5 fois ²	475,8	8,8	4,19	306	0,343	0,383	9,1
Trihydroxytoluène	en 1 fois	27,4	36,7	1,0	149	0,158	0,086	8,6
Trihydroxytoluène	en 5 fois ²	428	4,0	1,7	276	0,098	0,099	5,8 [4]
Acide hydroxy-orsellinique	en 1 fois	27,3	55,8	1,52	150	0,027	0,015	0,99
Ac. tétrahydroxy-bitolyl-dicarboxylique	en 1 fois	13,8	96,6	1,33	190	0,026	0,018	1,3
	en 1 fois	11,2	96,6	1,08	130	0,008	0,004	0,37
Tétrahydroxy-bitolyle	en 5 fois ²	112,4	10,0	1,12	202	0,004	0,003	0,27
Orcinoï	en 1 fois	35,8	14,9	0,53	220	0,010	0,008	1,5
Orcinoï	en 4 fois ²	32,1	14,9	0,48	181	0,021	0,014	2,9
Orcinoï	en 1 fois	96,7	160,4	15,5	42	0,720	0,11	0,7 [5]
Orcinoï	en 4 fois ²	131,3	3,9	0,52	188	0,015	0,010	1,9
Orcinoï	en 5 fois ²	483,3	4,6	2,22	266	0,085	0,082	3,7
Aldéhyde orsell.	en 5 fois ²	525,8	4,6	2,42	258	0,052	0,049	2,0

¹ Précurseur doublement marqué.

² Précurseur introduit en 4 à 5 portions à 2 jours d'intervalle. Exp. terminée 2 jours après la dernière adjonc. Tous les résultats sont rapportés à 200 ml de culture (4 cultures de 50 ml.)

plus haut, la substance IV apparaît bien comme un intermédiaire physiologique, puisque, dans des conditions favorisant l'adaptation, on observe non une augmentation, mais une diminution de l'incorporation de la radioactivité de IV dans la phoenicine. Une question intéressante se pose concernant le mode de conversion

de l'acide orsellinique (III) en triphénol IV. Formellement, il s'agit du remplacement d'un groupe carboxyle par un groupe hydroxyle, c'est-à-dire d'une «décarboxylation hydroxylante». On sait que maintes hydroxylations aromatiques se font par intervention d'oxygénases mixtes, d'après le principe indiqué par les équations (2) et (3). On peut alors se représenter les réactions concertées indiquées dans le schéma 3²⁾.

Deux molécules de trihydroxytoluène subiraient ensuite un couplage par dés-hydrogénation en position 4 pour fournir l'hexahydroxy-2,2',3,3',5,5'-bitolyle-4,4', c'est-à-dire le produit de réduction de la phoenicine. Cette «leucophoenicine» se rencontre régulièrement dans les milieux de culture, à côté de la phoenicine, en

Schéma 3

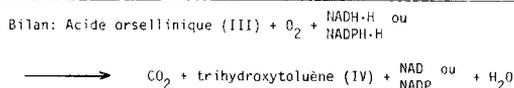
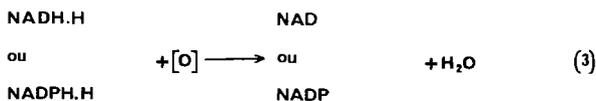
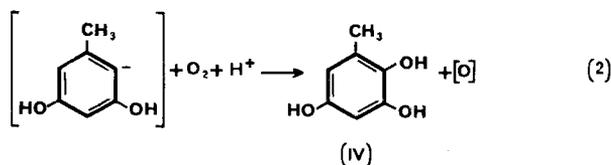
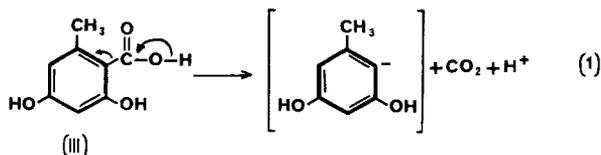


Tableau 3. Incorporation de l'acide orsellinique doublement marqué (¹⁴C-2 et di-³H-3,5) dans la phoenicine

A c. orsellinique				P h o e n i c i n e			Incorporation (%)
μmol	Radio-élément	Radioactivité spécifique (μCi/mmol)	Radioactivité totale (μCi)	Quantité produite (mg)	Radioactivité spécifique (μCi/mmol)	Radioactivité totale (μCi)	
25,8	¹⁴ C	8,1	0,21	236	0,052	0,045	21,4
	³ H	21,35	0,55		0,059	0,051	9,3
Rapports	³ H/ ¹⁴ C	a : 2,6			b : 1,13		b/a = <u>0,43</u>

²⁾ Ces équations sont globales. Elles représentent toute une suite complexe de réactions au niveau du système enzymatique, dans laquelle intervient notamment le cytochrome P-450

laquelle elle se convertit facilement par auto-oxydation dans les conditions physiologiques. Une confirmation de ce mécanisme a été fournie grâce à l'emploi d'acide orsellinique (III) doublement marqué (en 2 par ^{14}C et en 3,5 par ^3H). Alors que la décarboxylation hydroxylante ne causerait aucune perte en tritium, le couplage oxydatif du trihydroxytoluène en éliminerait la moitié. Le rapport, dans le précurseur IV, des radioactivités spécifiques $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ serait donc réduit de moitié dans la phoenicine. D'après le tableau 3, la diminution de ce rapport est la suivante: calculé: 50%; trouvé: 57%. La biosynthèse de la phoenicine s'effectuerait donc selon le schéma suivant:

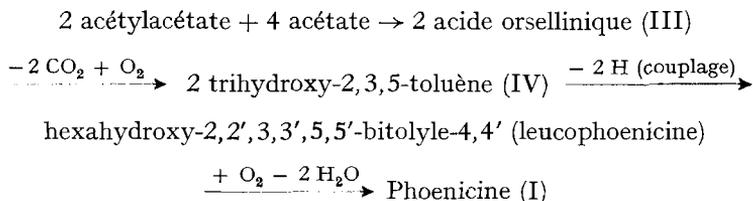


Tableau 4. Incorporation radioactive dans l'oosporéine

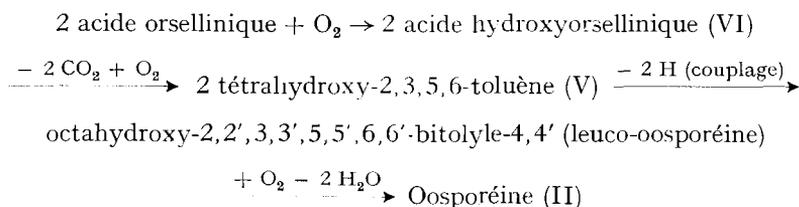
	Précurseur			Oosporéine			Incorporation dans l'oosporéine (%)	
	Mode d'introduction	Quant. introd. μmol	Radioactivité spécifique ($\mu\text{Ci}/\text{mmol}$)	Radioactivité totale (μCi)	Quantité produite (mg)	Radioactivité spécifique ($\mu\text{Ci}/\text{mmol}$)		Radioactivité totale (μCi)
Acétylacétate de Li	en 1 fois	50	13,9	0,69	69	0,108	0,024	3,5
Acétylacétate de Li	en 1 fois	38	13,9	0,53	124	0,045	0,018	3,4
Ac. orsellinique	en 1 fois	48,3	14,2	0,69	81	0,695	0,184	26,7
Ac. orsellinique	en 1 fois	25,8	14,2	0,37	123	0,328	0,132	35,7
Trihydroxytoluène	en 1 fois	28,4	36,7	1,04	50	0,400	0,065	6,2
Trihydroxytoluène	en 1 fois	32,2	36,7	1,18	115	0,400	0,150	12,7
Trihydroxytoluène	en 5 fois ¹	428	4,0	1,7	244	0,454	0,362	21,3 [A]
Acide hydroxy-orsellinique	en 1 fois	19,1	55,8	1,11	67	1,01	0,221	19,9
Dihydroxy-3,6-p-toluquinone	en 1 fois	24,2	265,9	6,43	56	4,11	0,752	11,7
	en 1 fois	27,5	265,9	7,31	129	3,08	1,30	17,8
Tétrahydroxy-bitolyle	en 5 fois ¹	162,4	10,0	1,62	372	0,0022	0,0027	0,17
Ac. tétrahydroxy-bitolyle-dicarboxylique	en 1 fois	11,4	96,6	1,10	60	0,033	0,0065	0,59
	en 1 fois	13,0	96,6	1,26	109	0,016	0,0057	0,45
Phoenicine	en 1 fois	14,6	6,03	0,088	317	0,00048	0,0005	0,57
Phoenicine	en 1 fois	72,9	6,03	0,44	342	0,0019	0,002	0,45
Phoenicine	en 1 fois	145,9	6,03	0,88	322	0,0028	0,003	0,34

¹ Précurseur intr. en 4-5 portions à 2 jours d'intervalle. Exp. terminée 2 jours après la dernière adjonction. Tous les résultats sont rapportés à 200 ml de culture (4 cultures de 50 ml.)

Oosporéine (II). Le tableau 4 indique une incorporation notable du trihydroxytoluène IV. Comme elle augmente considérablement dans des conditions favorables à l'adaptation, nous pensons que ce triphénol IV n'est pas un intermédiaire physiologique et que son incorporation résulte de la formation d'enzymes induits. De plus, le tableau 4 montre que la phoenicine qui, chez *P. phoeniceum*, se forme à partir du trihydroxytoluène IV, n'apparaît pas comme précurseur de l'oosporéine. On constate,

par contre, des incorporations importantes, sans adaptation préalable, de la radioactivité de l'acide hydroxyorsellinique- $[^{14}\text{CH}_3]$ (VI- $[^{14}\text{CH}_3]$) (19,9%) et de la dihydroxy-3,6-*p*-toluquinone (12 à 18%). Ce dernier composé pourrait se former, bien entendu, par hydroxylation du trihydroxytoluène IV, mais, pour les raisons mentionnées ci-dessus, nous avons exclu IV comme intermédiaire physiologique. Il nous paraît très probable que le tétrahydroxytoluène V, qui, par déshydrogénation, fournit la dihydroxytoluquinone, se forme à partir de l'acide hydroxyorsellinique (VI) par une «décarboxylation hydroxylante» analogue à celle qui intervient dans la biosynthèse de la phoenicine.

Le couplage, par déshydrogénation en 4, se fait donc à partir du tétraphénol V avec formation d'octahydroxy-2,2',3,3',5,5',6,6'-bitolyle-4,4' (leuco-oosporéine), puis d'oosporéine. Le schéma de biosynthèse de l'oosporéine, à partir de l'acide orsellinique, serait donc le suivant :



On voit que, lors des deux biosynthèses, le couplage par déshydrogénation se fait à partir d'un dérivé monophénylé contenant déjà le nombre d'hydroxyles nécessaire, en des emplacements convenables, pour conduire directement à la forme réduite des deux pigments diquinoniques. Notons enfin que tous les intermédiaires observés dans ces biosynthèses sont des produits qui ont déjà été trouvés dans la nature.

Nous remercions Mlle *Josiane Pinol* de sa précieuse collaboration technique. Les microanalyses ont été effectuées par M. le Dr *K. Eder*, Ecole de Chimie, Genève.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *J. Kalamar, E. Steiner, E. Charollais & Th. Posternak*, *Helv.* 57, 2368 (1974).
- [2] *E. Charollais, S. Fliszar & Th. Posternak*, *Arch. Sci.*, Genève 16, 474 (1963).
- [3] *S. Fliszar*, Thèse No 1377, Université de Genève (1965).
- [4] *E. Charollais & Th. Posternak*, C. r. Séances S.P.H.N. Genève, NS. 5, 138 (1970).
- [5] *S. H. El Basyouni & L. C. Vining*, *Canad. J. Biochemistry* 44, 557 (1966).
- [6] *A. J. Birch & R. I. Fryer*, *Austral. J. Chemistry* 22, 1319 (1969).
- [7] *G. Petterson*, *Acta chem. scand.* 19, 543 (1965).
- [8] *P. Simonart & H. Verachert*, *Bull. Soc. Chim. biol.* 48, 943 (1966); 49, 543 (1967); *G. Read, D. W. S. Westlake & L. C. Vining*, *Canad. J. Biochemistry* 47, 1071 (1969).
- [9] *G. Petterson*, *Acta chem. scand.* 17, 1771 (1963).
- [10] *G. Petterson*, *Acta chem. scand.* 18, 335 (1964).
- [11] *H. Brockmann & H. Muxfeldt*, *Chem. Ber.* 91, 1242 (1958).
- [12] *Y. Asahina & T. Kusaka*, *Bull. chem. Soc. Japan* 17, 152 (1942).
- [13] *D. V. Hagen & Th. Zincke*, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 16, 1558 (1888).
- [14] *W. K. Anslow & H. Raistrick*, *J. chem. Soc.* 1939, 1446.
- [15] *Fr. Fichter & H. Glaser*, *Liebigs Ann. Chem.* 361, 400 (1908).
- [16] *H. W. Dorn, W. H. Warren & J. L. Bullock*, *J. Amer. chem. Soc.* 61, 144 (1939).
- [17] *R. Adams & J. Levine*, *J. Amer. chem. Soc.* 45, 2373 (1923); *Ch. Grundmann & R. Richter*, *Chem. Ber.* 99, 2705 (1966).

- [18] *K. Hoesch*, Ber. deutsch. chem. Ges. *46*, 886 (1913).
 [19] *Hiraiwa*, Bull. pharm. Soc. Japan *60*, 569 (1940).
 [20] *N. B. Dean & W. B. Whalley*, J. chem. Soc. *1954*, 4639.
 [21] *H. L. Finkbeiner & M. Stiles*, J. Amer. chem. Soc. *85*, 616 (1963).
 [22] *A. Sonn*, Ber. deutsch. chem. Ges. *61*, 926 (1928); *J. Santesson*, Acta chem. scand. *24*, 3373 (1970).
 [23] *R. A. Kloss & D. A. Clayton*, J. org. Chemistry *30*, 3566 (1965).
 [24] *L. M. Hall*, Biochem. Prep., vol. *10*, p. 1.
 [25] *J. H. Birkinshaw & A. Gowlland*, Biochem. J. *84*, 342 (1962).
 [26] *T. Curtin, G. Fitzgerald & J. Reilly*, Biochem. J. *34*, 1605 (1940).
 [27] *Th. Posternak*, Helv. *21*, 1326 (1938).
 [28] *F. Kögl & G. C. van Wessem*, Rec. Trav. chim. Pays-Bas *63*, 5 (1944).
 [29] *G. A. Bray*, Analyt. Biochemistry *1*, 279 (1960).

260. The Dianion of Heptalene

by **Jean F. M. Oth, Klaus Müllen, Heinrich Königshofen,
 Jürgen Wassen and Emanuel Vogel**

Laboratory for Organic Chemistry, E.T.H., CH-8006 Zürich
 Institute for Organic Chemistry, Universität Köln, D-5 Köln

(4. IX. 74)

Summary. Heptalene – a very unstable compound – can be reduced by lithium at -80° into its dianion. ^1H - and ^{13}C -NMR. studies indicate that this dianion, contrary to the neutral molecule, has its π -bonds delocalized. The magnetic field induces in this species a large diamagnetic ring current. The dianion of heptalene is thermally very stable, much more so than the neutral compound. All these observations point to an appreciable stabilization energy associated with the 14π -electron system; this stabilization energy is probably large enough to impose a planar geometry to this dianion.

1. Introduction. – Recently we succeeded in establishing by ^{13}C -NMR. spectroscopy measurements carried out between -167° and -100° that the heptalene molecule shows, in its ground state, π -bond fixation but also undergoes an extremely fast π -bond shift process [1] [2]. The established π -bond fixation and the requirements

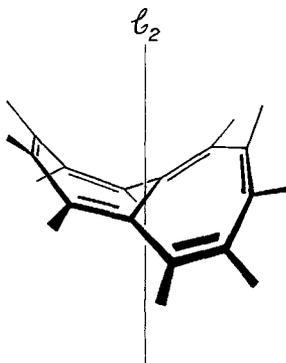


Fig. 1. *The most probable conformation of heptalene*