

PHYTOCHEMICAL REPORTS

CHIMIE DES CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGENES—LE BEAUVELLIDE, NOUVEAU CYCLODEPSIPEPTIDE ISOLE D'UN *BEAUVERIA TENELLA*

FRANÇOIS FRAPPIER*, PIERRE FERRON† et MARY PAIS*

* Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France; † Station de Recherches de Lutte Biologique, INRA, 78000 La Minière, France

(Received 10 May 1975)

Key Word Index—*Beauveria tenella*, *B. bassiana*, Fungi imperfecti, cyclodepsipeptides, beauvellide; isarolide

Les champignons appartenant au genre *Beauveria*, qui comprend seulement deux espèces, *B. bassiana* (Bals.) Vuillemin et *B. tenella* (Delacr.) Siemasko [= *B. brongniartii* (Saccardo) Petch[1]] sont connus pour leur pathogénicité vis-à-vis des insectes et leur utilisation pratique sous forme de préparations à base de spores a même été préconisée[2, 3]. Quelques études ont été effectuées dans le but de mettre en évidence la production de toxines par ces champignons[4]. Une seule substance toxique chimiquement définie a été isolée; il s'agit de la beauvericine extraite par Hamill *et al.*[5] d'une souche de *B. bassiana* (souche NRRL 3352). La beauvericine, qui est un cyclodepsipeptide dont la molécule comporte trois unités d'acide β -hydroxyvalérique alternant avec trois unités de *N*-méthylphénylalanine, présente une nette toxicité pour la crevette[5] et possède de plus un effet cytotoxique vis-à-vis de cellules d'invertébrés cultivées *in vitro* [6]. Un mélange de cyclodepsipeptides d'un type différent, dénommé 'isarolide' a, d'autre part, été isolé par Briggs[7] d'une souche d'*Isaria* species, qui s'est révélée ultérieurement être un *B. tenella* [1] mais ce produit n'a fait l'objet d'aucune recherche concernant sa toxicité éventuelle.

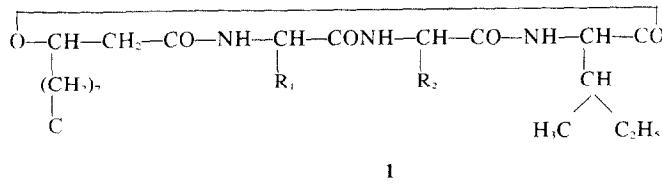
Nous avons entrepris, dans le cadre de nos travaux sur la virulence et la pathogénicité spécifique des champignons du genre *Beauveria* vis-à-vis des insectes ravageurs des cultures et des forêts[8-10], une étude chimique du mycélium de deux souches respectivement de

Beauveria tenella (La Minière, souche n° 6: ATCC N° 26156, isolée de *Melolontha melolontha* L.) et de *Beauveria bassiana* (La Minière, souche n° 32, isolée de *Leptinotarsa decemlineata* Say) dans le but de mettre en évidence les substances toxiques éventuellement présentes.

Les champignons ont été cultivés sur le milieu liquide décrit par Catroux *et al.*[11] pendant 72 hr. Après ce temps, la culture est centrifugée, puis le mycélium et les blastospores sont extraits par le méthanol. Les phases méthanoliques, concentrées et diluées à l'eau, sont ensuite soumises à une extraction par le chloroforme.

Par chromatographie sur alumine de l'extrait chloroformique obtenu à partir de *B. tenella*, trois produits ont pu être séparés: l'ergostérol et le perhydroergostérol, identifiés par leurs constantes physiques et spectrales, et un produit caractérisé par une forte insolubilité dans les solvants organiques. Après purification par cristallisation répétée dans le méthanol, ce dernier présente un point de fusion 261-262° et répond à la formule brute $C_{29}H_{45}O_5N_3$. Le spectre IR de ce dérivé dénommé beauvellide (bandes aromatiques à 3060, 3020, 750 et 700 cm^{-1} ; CONH à 3380, 3350, 1680, 1645 et 1540 cm^{-1} , ester à 1730 cm^{-1}) est compatible avec la structure d'un cyclodepsipeptide. L'examen du spectre de masse confirme cette hypothèse et permet de lui attribuer la formule 1 ($R_1 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; $R_2 = \text{Me}$).

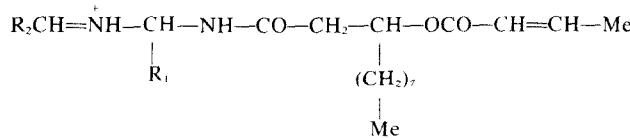
Les ions observés résultent, en effet, de fragmentations semblables à celles décrites pour les isarolides A, 1 [$R_1 = \text{CH}(\text{Me})_2$; $R_2 =$



1

$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$], B, 1 [$\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; $\text{R}_2 = \text{CHC}_2$] et C, 1 [$\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$][7].

Les principaux pics caractéristiques correspondent à des ruptures successives de l'ion linéaire (m/e 487) formé par perte de CO_2 à partir de l'ion moléculaire ($\text{M}^+ = 515$) (schéma 1). L'ion 2 à m/e 443 montre que l'acide aminé relié par une fonction ester au β -hydroxyacide est l'isoleucine et non la leucine. Enfin, les pics à m/e 120 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH} = \text{NH}_2^+$) m/e 44 ($\text{MeCH} = \text{NH}_2^+$), m/e 86 ($\text{C}_3\text{H}_8\text{CH} = \text{NH}_2^+$) et m/e 139 [$\text{Me}(\text{CH}_2)_2\text{CH} = \text{CH}$] $^+$ confirment la présence respective de la phénylalanine, de l'alanine, de l'isoleucine et de l'acide β -hydroxyundécanoïque.



2

Une preuve supplémentaire de la structure du beauvillide a été apportée par spectrométrie de masse de l'ester préparé par hydrolyse de la fonction lactone suivie d'estérification du carboxyle par le diazométhane. Cette technique—ouverture du cycle et mesure du spectre de masse de l'ester méthylique correspondant—a été précédemment préconisée pour la détermination de la structure d'autres cyclodepsipeptides[12]. La molécule linéaire obtenue subit des fragmentations successives

comparables à celles des peptides simples (schéma 2), chacun des ions formés étant accompagné ici d'un ion à m/e 18 dû à une élimination de la fonction hydroxyle. L'enchaînement des trois acides aminés et du β -hydroxyacide se trouve ainsi confirmé.

Dans le cas de l'étude du *B. bassiana*, la chromatographie de l'extrait chloroformique a également permis d'isoler les mêmes stérols que précédemment et une faible quantité d'un mélange de cyclodepsipeptides. Le spectre de masse de ce mélange présente trois pics moléculaires respectivement à $\text{M}^+ = 591$, $\text{M}^+ = 515$ et $\text{M}^+ = 543$. A l'ion $\text{M}^+ = 591$ correspond un depsipeptide de structure plane identique à celle

de l'isarolide C, 1 ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$) dont le spectre montre les principales fragmentations caractéristiques[7]. En ce qui concerne les pics $\text{M}^+ = 515$ et $\text{M}^+ = 543$, il peut s'agir pour le premier du beauvillide et pour le deuxième des isarolides A ou B, mais aussi bien de depsipeptides isomères ou de mélanges. En effet, l'impossibilité d'isoler les depsipeptides produits par *B. bassiana* à l'état pur alliée à la faible intensité ou la superposition de plusieurs ions dans le spectre de masse du mélange rend, à

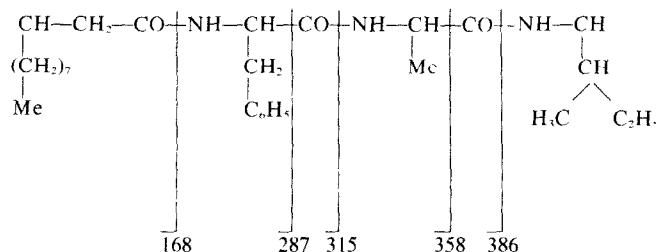


Schéma 1 Fragmentation de l'ion m/e 487 ($\text{M}-\text{CO}_2$)

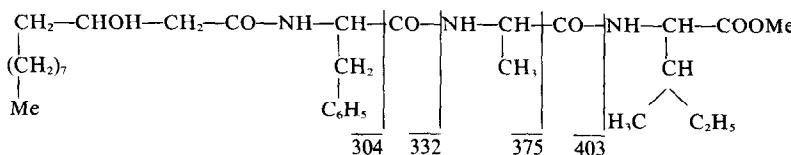


Schéma 2 Fragmentation de l'ester dérivé du beauvillide

l'heure actuelle, une identification exacte impossible.

Au cours de ce travail des depsipeptides de structure très voisine ont été isolés de *B. bassiana* et de *B. tenella*. Ces depsipeptides sont également très comparables ou identiques aux isarolides obtenus par Briggs[7] à partir d'une souche de *B. tenella* différente de la nôtre. Par contre, il apparaît que la souche de *B. bassiana* que nous avons étudiée ne produit pas la beauvericine[5] dans les conditions de culture utilisées.

Une étude de l'action du beauvillide sur des cultures de tissus d'invertébrés selon la méthode mise au point pour la beauvericine[6] a été entreprise et un effet cytotoxique a été mis en évidence. Les résultats détaillés de ce travail seront publiés ultérieurement.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion, pris en tube capillaire ne sont pas corrrigés. Les spectres IR ont été déterminés dans le nujol ou en laque. Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés avec le polarimètre électronique Perkin-Elmer, dans le CHCl_3 , à une température de 20° pour des concentrations voisines de 1%. Les analyses ont été effectuées dans le Laboratoire de Microanalyse du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette.

Culture et extraction des champignons *B. bassiana* et *B. tenella* ont été cultivés sur milieu liquide, selon la technique décrite par Catroux et al.[11]. Après 72 hr d'agitation à $23^\circ \pm 1$, le milieu (4 l) est centrifugé à 0° (9000 tours/min) pendant 15 min. Le mycélium et les blastospores sont séparés et extraits 3x à 20° par 500 cm^3 MeOH, sous forte agitation mécanique. Les deux premiers extraits méthanoliques sont réunis et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le liquide visqueux obtenu, dilué à H_2O , est extrait 3 fois par le CHCl_3 . Les phases organiques lavées à l'eau, séchées et évaporées sous pression réduite donnent un premier résidu (extrait chloroformique 1). Le troisième extrait méthanolique conduit de la même façon à l'extrait chloroformique 2.

Chromatographie des extraits chloroformiques obtenus à partir du B. tenella L'extrait 1 (0,430 g) est chromatographié sur 30 x son poids d'alumine standard (activité II, III Merck). Les fractions élues au CH_2Cl_2 (0,040 g) sont cristallisées dans l'acétone-hexane et fournissent 0,020 g de perhydroergostérol, F $176\text{--}177^\circ$, $[\alpha]_D = -35^\circ$. Analyse: $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ (Calc C 78,45; H 10,35; O 11,20. Tr C 78,65; H 10,28, O 11,25) Les fractions élues au $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--MeOH}$, 95/5 (0,030 g) sont recristallisées 3 fois dans le MeOH et donnent 0,014 g de beauvillide, 1. F $261\text{--}262^\circ$, Analyse $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_5\text{N}_3$

(Calc C 67,54, H 8,80; O 15,51; N 8,15. Tr C 67,39, H 8,86, O 15,45; N 8,23) L'extrait 2 (0,270 g) est chromatographié de même sur 8 g d'alumine. Les fractions élues au CH_2Cl_2 (0,050 g) sont cristallisées dans le MeOH et fournissent 0,027 g d'ergostérol, F 165° non déprimé par mélange à un échantillon de référence, $[\alpha]_D = -129^\circ$, IR (nujol) superposée à celui de l'échantillon.

Chromatographie des extraits chloroformiques obtenus à partir de B. bassiana. Les extraits chloroformiques obtenus à partir du mycélium ont été chromatographiés sur alumine de la même façon que pour *B. tenella*. Les fractions correspondant à l'extrait 2 (0,370 g) élues au $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--MeOH}$ (99:1) (0,01 g) donnent par cristallisation dans l'EtOH 0,004 g d'un mélange de depsipeptides. IR (nujol). CONH à 3370, 3300, 1680, 1640 et 1535 cm^{-1} , ester à 1730 cm^{-1} .

Préparation de l'ester dérivé du beauvillide. On dissout 5,5 mg de beauvillide dans 1,6 cm³ MeOH et ajoute 0,4 cm³ de soude 2N. Après une nuit de contact à la température ambiante, le milieu réactionnel est acidifié par de l'acide chlorohydrique dilué et extrait au CH_2Cl_2 . Les phases organiques lavées, séchées et évaporées à sec, fournissent un résidu pesant 4,5 mg qui est redissout dans 0,5 cm³ MeOH, puis additionné de 0,5 cm³ de solution éthérée de CH_2N_2 . Après 30 mn de contact, la mixture est évaporée et donne 4,5 mg d'ester méthylique. IR (laque) CONH à 3290, 1640 et 1540 cm^{-1} , ester à 1725 cm^{-1} .

Remerciements—Nous remercions M. F-X Jarreau qui a suivi de très près ce travail.

REFERENCES

- 1 De Hogg, G. S. (1972) *Stud. Mycology*, CBS Baarn, 1
- 2 Roberts, D. W. et Yendol, W. G. (1971) *Microbial Control of Insects and Mites*, (Burges, H. D. et Hussey, N. W. eds) p. 125, Academic Press, London.
- 3 Ferron, P. (1970) *Ann Zool Ecol. Amin*, n° hors série 3, 117
- 4 Lysenko, O. et Kucera, M., (1971) *Microbial Control of Insects and Mites*, (Burges, H. D. et Hussey, N. W. eds), p. 205, Academic Press, London
- 5 Hamill, R. L., Higgens, C. E., Boaz, H. E. et Gorman, M. (1969) *Tetrahedron Letters* 4255.
- 6 Vey, A., Quiot, J. et Vago, C. (1973) *C. R. Acad. Sci., Paris*, **276**, (Série D), 2489
- 7 Briggs, L. H., Fergus, B. J. et Shannon, J. S. (1966) *Tetrahedron* (Suppl. 8) Part 1, 269.
- 8 Segretain, G., Paris, S., Ferron, P., et Arcouteil, A. (1971) *C. R. Acad. Sci., Paris*, (série D) **273**, 140
- 9 Fargues, J., Duriez, T., Andrieu, S. et Popeye, R. (1974) *C. R. Acad. Sci. Paris*, (série D) **278**, 2245
- 10 Ferron, P. et Robert, P. H. (1975) *J. Invertebrate Pathol* sous presse
- 11 Catroux, C., Calvez, J., Ferron, P. et Blachere, H. (1970) *Ann Zool Ecol. Anim.* **2**, 281
- 12 Compernolle, F., Vanderhaegue, H. et Janssen, G. (1972) *Org Mass Spectrometry* **6**, 152.