

COMPOSITION EN STEROLS ET EN ACIDES GRAS DE DEUX SOUCHES D'*ASPERGILLUS FLAVUS*

MARIE-JEANNE VACHERON et G. MICHEL

Laboratoire de Chimie Biologique, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69-Villeurbanne

(Received 19 March 1968)

Résumé—La fraction acide des lipides d'*Aspergillus flavus* renferme essentiellement les acides palmitique, oléique, linoléique et α hydroxytétracosanoïque.

Nous avons isolé de la fraction insaponifiable plusieurs composés de nature stérolique: l'ergostérol, le peroxyde d'ergostérol et un autre stérol $C_{28}H_{46}O_3$ qui est vraisemblablement le cérévistérol. Ces deux derniers composés n'apparaissent pas lorsque les opérations sont effectuées en l'absence de lumière. Ils représentent donc des artéfacts et non des métabolites d'*A. flavus*.

Abstract—The fatty acids of *Aspergillus flavus* are essentially: palmitic, oleic, linoleic and α hydroxytetracosanoic acids. Three sterols have been found in the unsaponifiable part: ergosterol, ergosterol peroxide and a sterol $C_{28}H_{46}O_3$ which is probably cerevisterol. These two last sterols are not present when all operations are conducted in the dark. They are not metabolites of *A. flavus* but artefacts arising from ergosterol.

INTRODUCTION

L'ANALYSE des lipides de plusieurs espèces d'*Aspergillus flavus* a montré que les constituants essentiels sont représentés par des stérols et des acides gras en C_{16} et C_{18} .¹ Si l'ergostérol a été trouvé dans de nombreuses espèces de moisissures, levures et champignons, la présence d'autres stérols prête à discussion. Le peroxyde d'ergostérol en particulier a été considéré comme un composé naturel isolé de *Trichophyton schönleini*,² *Daedalea quercina*,³ *Penicillium sclerotigenum*.⁴ Pour Hamilton et Castrejon,⁵ le peroxyde d'ergostérol est un intermédiaire dans la biosynthèse de l'ergostérol. Cependant Adam *et al.*⁶ observent chez *Piptoporus betulinus* et *D. quercina* l'absence de peroxyde d'ergostérol dans les extraits fraîchement préparés et sa formation ultérieure à partir de l'ergostérol.

Dans le but de préciser les mécanismes de la biogénèse des stérols chez *Aspergillus*, nous avons étudié la composition en lipides de deux souches d'*A. flavus*.

RESULTATS

L'extrait éthéro-alcoolique total donne après saponification 78 % d'acides gras et 22 % d'insaponifiable.

¹ M. STEINER, Die Fette der Pilze dans *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Band VII, p. 70, Springer-Verlag, Berlin (1957).

² G. BAUSLAUGH, G. JUST et F. BLANK, *Nature* **202**, 1218 (1964).

³ Y. TANAHASHI et T. TAKAHASHI, *Bull. Chem. Soc. Japan* **39**, 848 (1966).

⁴ S. M. CLARKE et M. MCKENZIE, *Nature* **213**, 504 (1967).

⁵ J. G. HAMILTON et R. N. CASTREJON, *Fed. Proc.* **25**, 221 (1966).

⁶ H. K. ADAM, I. M. CAMPBELL et N. J. MCCORKINDALE, *Nature* **216**, 397 (1967).

1. *Etude des Acides Gras*

Les acides gras sont estérifiés par le diazométhane et les esters chromatographiés sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt. Deux fractions essentielles sont recueillies, l'une est éluée par le benzène, l'autre par le solvant benzène-éther 1:1. Le spectra infra-rouge de chaque éluat indique que la première fraction (90%) est constituée d'acides gras non hydroxylés et la deuxième fraction (10%) d'acides gras hydroxylés.

Acides gras non hydroxylés. La composition et le pourcentage des acides gras non hydroxylés des deux souches sont résumés dans le Tableau 1:

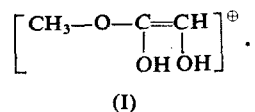
TABLEAU 1. ACIDES GRAS NON HYDROXYLÉS DES DEUX SOUCHES D'*Aspergillus flavus*

	C ₁₆	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}
<i>A. flavus</i> (Link)	21	9	37	32
<i>A. flavus</i> N. 855 (Inst. Past.)	20	5	31	43

Le palmitate et le stéarate de méthyle sont identifiés par chromatographie gaz-liquide en mélange avec les esters méthyliques d'acides témoins. On note également la présence de traces d'esters d'acides saturés en C₁₂, C₁₄, C₁₅, C₁₇, C₂₀, C₂₂ et C₂₄.

Les esters éthyléniques sont caractérisés par hydrogénation catalytique. La position des doubles liaisons est précisée par coupure oxydative par le mélange permanganate-periodate, selon Chang et Sweeley⁷ et identification par CGL des produits d'oxydation obtenus.

Acides gras hydroxylés. La fraction éluée par le mélange benzène-éther représente 10% des esters méthyliques. Le spectre infra-rouge possède les bandes hydroxyle et ester. Testée par chromatographie en couches minces sur gel de silice dans plusieurs solvants, elle donne une tache principale. Nous l'avons isolée par CCM préparative en utilisant le solvant benzène-méthanol (97:3). Le spectre de masse indique un poids moléculaire à $m/e = 398$ correspondant à C₂₅H₅₀O₃. On observe un pic à $m/e = 339$, M - 59. Il provient du départ du groupement -COOCH₃, ce qui est en accord avec la présence d'un hydroxyle en α pour l'ester méthylique. D'autre part, on observe un pic à $m/e = 90$ caractéristique des esters α hydroxylés, il correspond au fragment (I)



Il s'agit donc de l'ester méthylique de l'acide 2-hydroxytétracosanoïque. Notons la présence en très faible quantité des esters homologues correspondant aux α hydroxyacides à 22, 23, 25 et 26 atomes de carbone. Pour confirmer la position de la fonction alcool nous avons traité l'acide hydroxylé par le tétracétate de plomb selon Kishimoto et Radin.⁸ L'aldéhyde obtenu est oxydé par l'oxyde d'argent, l'acide est méthylé puis étudié par CGL sur colonne de silicone SE 30. On observe la présence du tricosanoate de méthyle.

⁷ T. CHANG et C. C. SWELEY, *J. Lipid Res.* **3**, 170 (1962).

⁸ Y. KISHIMOTO et N. S. RADIN, *J. Lipid Res.* **1**, 80 (1959).

2. Etude de la Fraction Insaponifiable

La fraction insaponifiable est riche en stérols comme l'indique la réaction de Lieberman-Burchard fortement positive. Elle est étudiée par chromatographie en couches minces sur gel de silice. On observe la présence de plusieurs stérols, les trois plus importants A, B, C ayant pour R_f respectifs: 0,71, 0,54 et 0,31 dans le solvant chloroforme-méthanol (94:6). Ils sont séparés par CCM préparative.

Stérol A. Le stérol A est identifié à l'ergostérol par ses caractéristiques physiques: F. 164°, $[\alpha]_D = -125^\circ$, son spectre ultra-violet: $\lambda_{\max} = 271, 282, 293$ nm ($\epsilon = 10\,500, 11\,000, 6\,000$), et son comportement par CCM sur gel de silice dans les solvants suivants: chloroforme-méthanol 94:6 R_f : 0,71; benzène-acétate d'éthyle 70:30, R_f : 0,70; et hexane-éther 1:1, R_f : 0,42.

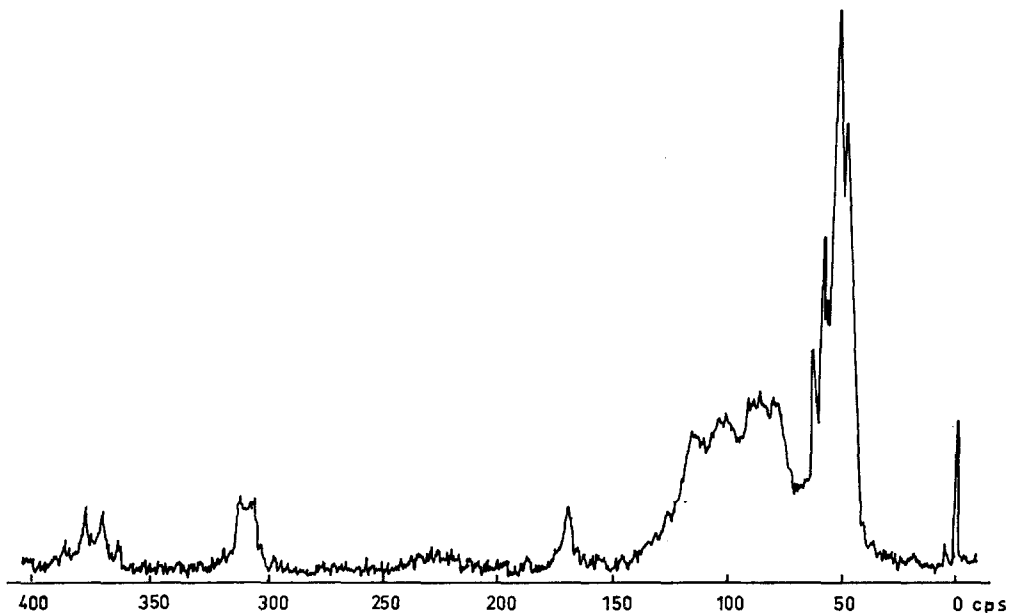


FIG. 1. SPECTRE DE RMN DU STÉROL B (PEROXYDE D'ERGOSTÉROL).

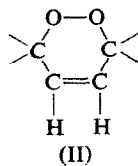
Stérol B.* Le stérol B de $R_f = 0,54$ a été identifié au peroxyde d'ergostérol. Il est recristallisé dans l'acétate d'éthyle et dans le méthanol. F. 174–176°, $[\alpha]_D = -27^\circ$ ($c = 2,76$). Le spectre ultra-violet présente une absorption à 204 nm ($\epsilon = 4700$ dans l'éthanol) avec un épaulement vers 220 nm. L'analyse élémentaire est en faveur d'un stérol fortement oxygéné (Anal. C 77,72, H 10,28. Calculé pour $C_{28}H_{44}O_3$: C 78,45, H 10,35%.)

La présence d'une double liaison dans la chaîne latérale et sa position ont été démontrées par l'étude des produits d'ozonolyse réductrice. L'hydrazone de l'aldéhyde volatil est identique à celle qui est obtenue en traitant l'ergostérol dans les mêmes conditions.

Le spectre de R.M.N. (Fig. 1) présente des pics à 47,5, 51, 57, 61,5 cps correspondant aux groupements $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2$, à 168 cps pour le proton du groupement OH et à 225 cps pour un proton fixé sur un atome de carbone secondaire hydroxylé. On trouve dans la

* Nous remercions vivement Monsieur M. Barbier, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif sur Yvette, pour ses précieux conseils au sujet de ce stérol.

région des protons éthyléniques deux multiplets, l'un centré à 308 cps, l'autre à 374 cps correspondant chacun à 2 protons; le déplacement vers 374 cps ne peut être dû qu'à la présence d'un atome électrophile au voisinage des deux protons, correspondant au groupement II.



Le spectre de masse (Fig. 2) présente le pic moléculaire à $m/e=428$ ($C_{28}H_{44}O_3$), des pics correspondant au départ de 1, 2, 3 molécules d'eau à $m/e=410$ $M - 18$, 392 $M - (18 \times 2)$, 374 $M - (18 \times 3)$, des pics correspondant au départ de 2 molécules d'eau et d'un groupement CH_3 à $m/e=377$ $M - (18 \times 2 + 15)$ et de deux molécules d'eau et d'un atome d'oxygène à $m/e=376$ $M - (18 \times 2 + 16)$. Le pic à $m/e=303$ $M - 125$ correspond au départ de la chaîne latérale. C'est une chaîne monoéthylénique en C_9 . D'autre part on observe une série de pics correspondant aux pics précédemment indiqués avec départ de la chaîne latérale soit: $m/e=285$ $M - (125 + 18)$, 267 $M - (125 + 18 \times 2)$, 251 $M - (125 + 18 \times 2 + 16)$, 249 $M - (125 + 18 \times 3)$.

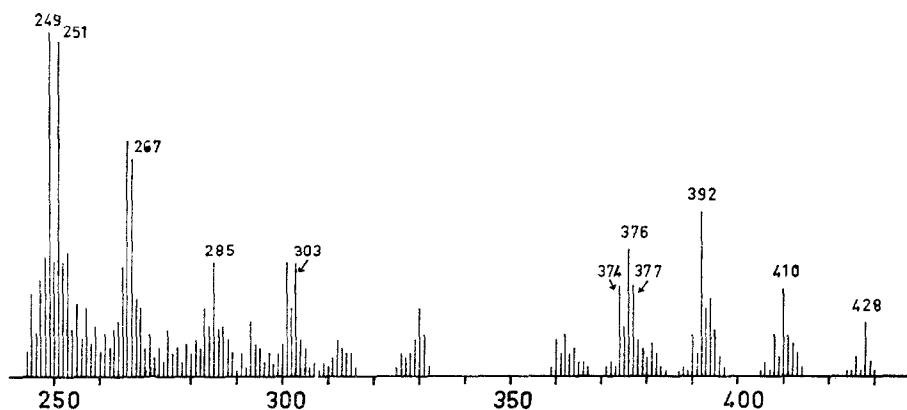


FIG. 2. SPECTRE DE MASSE DU STÉROL B (PEROXIDE D'ERGOSTÉROL).

La présence d'une seule fonction alcool et de 3 atomes d'oxygène est confirmée par les spectres de masse de l'acétate et de l'éther triméthylsilylé. Le pic moléculaire de l'acétate à $m/e=470$ indique la présence d'un seul groupement acétyle. On retrouve d'autre part les mêmes pics que pour le stérol à $m/e=392$, 376 et 374 et à $m/e=285$, 267 et 249 .

Le dérivé triméthylsilylé présente le pic moléculaire à $m/e=500$ correspondant à la fixation d'un seul groupement triméthylsilyle. On trouve un pic à $m/e=468$ $M - 32$ correspondant au départ des deux atomes d'oxygène du pont peroxydique et les pics à $m/e=410$ $M - 90$ correspondant au départ de $(CH_3)_3SiOH$ et à $m/e=363$ $M - (90 + 32 + 15)$.

L'ensemble de ces résultats ainsi que l'identité des caractéristiques physiques entre le composé préparé à partir de l'ergostérol selon Windaus et Brunken⁹ et le stérol B confirment la nature du stérol naturel: c'est le peroxyde d'ergostérol.

⁹ A. WINDAUS et J. BRUNKEN, *Ann.* **460**, 225 (1928).

Stérol C. Le stérol C est préparé en faible quantité par chromatographie en couches minces. Le point de fusion du composé F.225° est en accord avec la valeur indiquée par Starratt et Madosingh¹⁰ pour le cérévistérol. La structure a été précisée par spectrométrie de masse (Fig. 3). Le pic moléculaire à $m/e=430$ correspond à un stérol $C_{28}H_{46}O_3$ trihydroxylé et diéthylénique. On observe effectivement le départ de 1, 2, 3 molécules d'eau donnant des pics à $m/e=412 M - 18$, $394 M - (18 \times 2)$, $376 M - (18 \times 3)$, $361 M - (18 \times 3 + 15)$. Par contre aucun pic n'est présent à $m/e=378 M - (18 \times 2 + 16)$ avec départ d'oxygène comme nous l'avions remarqué pour le peroxyde d'ergostérol. La chaîne latérale est monoéthylénique comme celle de l'ergostérol ainsi que le montre le pic à $m/e=251 M - (18 \times 3 + 125)$.

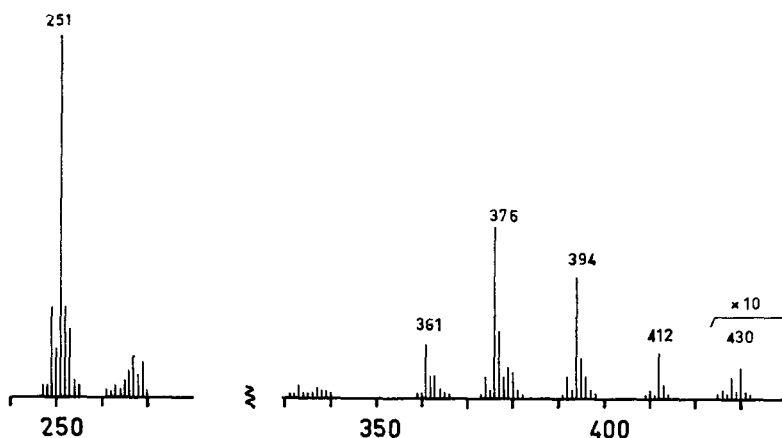


FIG. 3. SPECTRE DE MASSE DU STÉROL C (CÉRÉVISTÉROL).

Le spectre de masse est donc celui d'un stérol trihydroxylé diéthylénique avec une double liaison dans la chaîne latérale. Il est vraisemblable qu'il s'agit du cérévistérol qui accompagne souvent l'ergostérol dans les levures¹¹ et qui a été isolé d'*Amanita phalloïdes* et de *Claviceps purpurea*.¹²

VARIATION DES PROPORTIONS DE STEROLS ET DISCUSSION

Nous avons recherché la répartition quantitative des différents stérols. Au cours des préparations, nous avons constaté que les proportions relatives subissaient des variations importantes avec le temps.

Les extraits stéroliques fraîchement préparés sont riches en ergostérol, renferment du peroxyde d'ergostérol en faible quantité et des traces de cérévistérol. Lorsque les extraits sont étudiés au bout de quelques jours, la proportion de peroxyde d'ergostérol et de cérévistérol augmente. En utilisant des extraits préparés depuis plusieurs mois, on constate la disparition totale de l'ergostérol et la présence de peroxyde d'ergostérol en quantité prépondérante accompagné de cérévistérol et d'autres stérols en faible quantité. Le comportement de ces derniers par chromatographie en couches minces indique qu'il s'agit de stérols polyhydroxylés.

¹⁰ A. N. STARRATT et C. MADHOSINGH, *Can. J. Microbiol.* **13**, 1351 (1967).

¹¹ E. M. HONEYWELL et C. E. BILLS, *J. Biol. Chem.* **99**, 71 (1932).

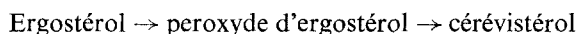
¹² H. WIELAND et G. COUTELLE, *Ann.* **548**, 270 (1941).

On pouvait alors se demander si la présence de peroxyde d'ergostérol et de cérévistérol était naturelle ou bien si elle était la conséquence d'une oxydation de l'ergostérol lors des manipulations, oxydation fortement favorisée par la lumière.⁹ Les cultures étant effectuées à l'obscurité, une oxydation accidentelle ne pouvait avoir lieu qu'au cours de l'extraction et de la préparation des stérols. Nous avons effectué un cycle complet d'opérations: cultures, extractions, purification et isolement dans l'obscurité. On n'observe dans ce cas aucune trace de peroxyde d'ergostérol ou de cérévistérol; le seul stérol présent est l'ergostérol.

Ce résultat indique de façon formelle que les "compagnons" de l'ergostérol chez *Aspergillus flavus* sont des artéfacts et non des métabolites du microorganisme.

On pouvait en effet supposer que le peroxyde d'ergostérol était un intermédiaire bio-génétique de l'ergostérol. C'est d'ailleurs la conclusion à laquelle ont abouti Hamilton et Castrejon⁵ avec *Saccharomyces cerevisiae* en cultivant la levure sur l'acétate marqué. Il est possible que le peroxyde d'ergostérol participe effectivement au métabolisme de la levure; il convient cependant de garder la plus grande prudence étant donné la facilité avec laquelle l'ergostérol est oxydé en peroxyde. L'oxydation fait intervenir l'oxygène atmosphérique, la lumière et des composés jouant un rôle photo-sensibilisateur,¹³ il est certain que les pigments présents dans les lipides des microorganismes⁶ peuvent catalyser cette autooxydation, ce qui explique la rapidité d'apparition des produits d'oxydation de l'ergostérol au cours des manipulations.

Après une étude des produits d'oxydation de l'ergostérol, Fürst¹⁴ propose la filiation suivante:



L'apparition en quantité croissante en premier lieu du peroxyde d'ergostérol puis du cérévistérol dans les extraits d'*A. flavus* est parfaitement en accord avec ces conclusions.

PARTIE EXPERIMENTALE

Cultures

Un premier lot de mycélium d'*Aspergillus flavus* (Link) a été cultivé industriellement sur milieu complexe.* D'autres cultures ont été réalisées sur milieu de Sauton soit avec la même souche: *A. flavus* (Link) soit avec une autre souche d'*A. flavus* No. 855 de l'Institut Pasteur (Paris).

Extraction et Fractionnement des Lipides

Le mycélium cultivé sur milieu de Sauton est récolté au bout d'une semaine, séparé du milieu par filtration et lavé. Il est ensuite extrait par le mélange chloroforme-méthanol 1:1 à froid avec agitation. L'extraction est répétée 3 fois. Elle a été réalisée tantôt à la lumière, tantôt à l'obscurité. Le mycélium industriel est extrait dans les mêmes conditions à la lumière.

L'extrait lipidique total est saponifié par la potasse en solution méthanolique par chauffage sous reflux pendant 5 heures. Les fractions acide et insaponifiable sont ensuite séparées par partage entre une solution aqueuse de soude et l'éther.

Identification des Composés

Les acides sont analysés sous forme d'esters méthyliques par chromatographie gaz-liquide sur colonne de DEGS à 180° et de silicone SE 30 à 205° en présence d'esters témoins. Les stérols sont étudiés par chromatographie en couches minces en présence d'ergostérol et de peroxyde d'ergostérol préparé selon la méthode de Windaus et Brunken.⁹ La révélation est effectuée par pulvérisation d'une solution chloroformique de trichlorure d'antimoine. La chromatographie en couches minces préparative permet l'isolement de chaque stérol.

* Le mycélium nous a été gracieusement fourni par Monsieur P. Debyser de la Société Rapidase, Seclin (Nord).

¹³ P. WIELAND et V. PRELOG, *Helv. Chim. Acta* **30**, 1028 (1947).

¹⁴ W. FÜRST, *Arch. Pharm.* **2**, 144 (1967).

L'acétate du peroxyde d'ergostérol est préparé par action de l'anhydride acétique dans la pyridine à 37° pendant 20 heures.

Le dérivé triméthylsilylé du peroxyde d'ergostérol a été formé par l'action de l'hexaméthyldisilazane dans la pyridine à 80° pendant 2 heures sous atmosphère d'azote.

L'ozonolyse est effectuée sur 10 à 12 mg de produit. Elle permet de préciser la position de la double liaison dans la chaîne latérale. Après ozonisation, l'ozonide est coupé par la triphénylphosphine,¹⁵ les aldéhydes et cétones volatils sont entraînés à vapeur d'eau et recueillis dans une solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine. Les hydrazones sont testées par CCM¹⁶ dans le solvant hexane-éther-alcool (88:10:2).

Les spectres de masse ont été effectués sur un appareil A.E.I., M.S. 9 à introduction directe; les spectres R.M.N. sur un spectromètre Varian A-60 dans le CCl₄. * Les spectres infra-rouge sont réalisés avec un appareil Perkin-Elmer, Infra-cord, les spectres ultra-violetts sont également réalisés avec un appareil Perkin-Elmer. Les pouvoirs rotatoires sont mesurés avec un polarimètre électronique Roussel-Jouan.

Remerciements—Nous remercions Monsieur le Professeur E. Lederer de l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

* Les spectres de masse et de R.M.N. ont été réalisés à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif sur Yvette.

¹⁵ R. A. STEIN et N. NICOLAIDES, *J. Lipid Res.* **3**, 476 (1962).

¹⁶ C. BORDET et G. MICHEL, *C. R. Acad. Sci.* **256**, 3482 (1963).