

SUR LA PRESENCE DE MYCOSPORINES-GLUTAMINE REDUITES, NOUVELLES MOLECULES,  
CHEZ PLUSIEURS DEUTEROMYCETES.

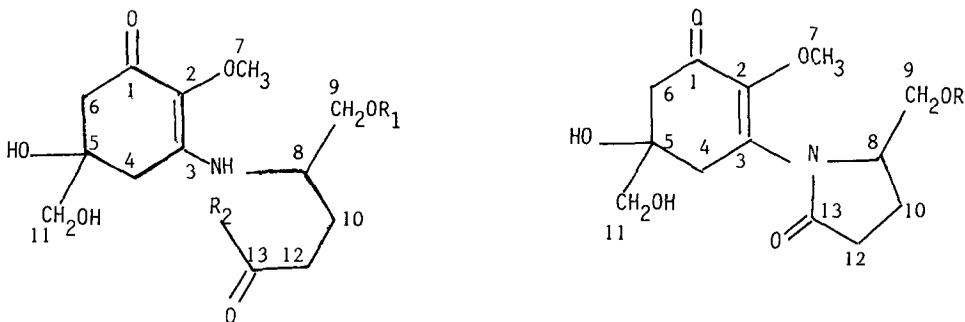
Jean-LOUIS PITTET, Marie-Louise BOUILLANT, Jacques BERNILLON, Noël ARPIN et Jean FAVRE-BONVIN

Université Claude Bernard LYON-1, Département de Biologie Végétale, Service de Mycochimie,  
 43 Bd du 11 nov. 1918, F-69622 VILLEURBANNE CEDEX (LA CNRS n°44).

Abstract - The isolation and structures of new widespread mycosporine reduced-glutamine (3) and its glucoside (4) are described. HPLC and new MS improvements (FABS and direct HPLC-MS coupling) provide convenient methods for the study of these unstable compounds.

Au cours de nos travaux sur la biochimie du développement des champignons supérieurs, portant plus précisément sur les mycosporines<sup>1</sup>, nous avons constaté, par chromatographie liquide haute performance (CLHP), la présence chez *Trichothecium roseum* (Pers.) LINK ex GRAY de deux de ces substances, A et B, représentant respectivement 95 et 5% de l'absorption à 310 nm d'un extrait hydro-alcoolique. Contrairement à ce que nous avons observé jusqu'alors pour la purification de tels composés<sup>2</sup>, l'utilisation de résine échangeuse de cations, DOWEX 50 WX 8, forme H<sup>+</sup>, en colonne ouverte, s'est révélée inefficace pour leur séparation. Par contre la CLHP, sur ce même type de résine, nous a permis de les séparer à l'état pur; nous avons pu noter qu'à chaque purification A se transforme partiellement en B, plus stable; ce phénomène a également été observé avec la mycosporine glucosylée (4) isolée d'*Ascochyta fabae* Speg..

Le composé B a pu être facilement identifié (RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, SM, CLHP) à la mycosporine acide glutamique réduit (1) décrite antérieurement<sup>3</sup>. Par contre A s'est avéré différent et beaucoup plus labile que la mycosporine acide pyroglutamique réduit (2) isolée de *Botrytis cinerea*<sup>4</sup>.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
<u>1</u>	H	OH	<u>2</u> R= H
<u>3</u>	H	NH <sub>2</sub>	<u>6</u> R= Glucosyl
<u>4</u>	Glucosyl	NH <sub>2</sub>	
<u>5</u>	Glucosyl	OH	

Les spectres de RMN-<sup>13</sup>C (Tableau I) de A et de B, très proches, indiquent l'existence de squelettes carbonés identiques pour ces deux molécules. Par contre, en RMN-<sup>1</sup>H, on note dans le spectre de A la présence de deux H échangeables à δ:6,84 ppm, absents de celui de B.

Tableau I - Spectres de RMN-<sup>13</sup>C des mycosporines: δ en ppm/TMS (Solvant: pyridine).

C n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<u>1</u> (B)	186,4	131,1	159,9	31,5	73,1	43,9	60,3	55,8	65,3	27,1	68,6	34,6	178,9
<u>2</u>	181	134	171	38,5	75,9	43,1	64	60,8	67,5	29,3	71,5	34,1	179
<u>3</u> (A)	186,4	131,1	159,8	32,5	73,1	43,9	60,2	55,9	65,3	27,6	68,6	34,6	179
<u>4</u>	186,9	131,3	159,4	32,5	73	43,9	60,4	53,7	68,9	27,6	71,7	34,9	179,3
Glucosyl: 99,1 - 74,3 - 73 - 72,2 - 70,3 - 61,5													

Les spectres de masse en impact électronique (EI) de A et de B étant la plupart du temps identiques, nous avons eu recours au couplage direct CLHP-SM (introduction de 1% du flux de la CLHP dans le SM, sans évaporation du solvant) pour constater que le MH<sup>+</sup> de A était à m/z: 303 alors que celui de B était bien à m/z: 304. Ce résultat a pu être confirmé par Désorption-Ionisation chimique (D/CI).

La différence de 1 uma observée en SM, la similitude des spectres UV et de RMN-<sup>13</sup>C peuvent s'interpréter par la présence dans A de CONH<sub>2</sub>, facilement hydrolysable en COOH dans B; ceci explique bien, en outre, l'existence du signal de deux H échangeables à 6,84ppm en RMN-<sup>1</sup>H.

Ceci a été vérifié par SM des dérivés TMS de A et de B, réalisée à l'aide de couplages Chromatographie en phase gazeuse-SM rendus nécessaires par la présence de sous-produits réactionnels (Tableau II). Comme nous l'avons fréquemment observé dans cette série de composés, les spectres de masse obtenus correspondent aux formes déshydratées et aromatisées du noyau.

Tableau II - Spectres de masse des dérivés TMS: CP-Sil 5; 25m; He: 1 ml/mn; T° colonne: 230°C.

<u>1</u>	Temps de rétention: 9,25 mn : M/z: 573 (15%; M <sup>+</sup> ); 558 (15%; M-CH <sub>3</sub> ); 470 (100%; M - CH <sub>2</sub> OTMS); 380 (70%).
<u>2</u>	Temps de rétention: 7,30 mn : M/z: 483 (10%; M <sup>+</sup> ); 468 (10%; M-CH <sub>3</sub> ); 380 (100%; M - CH <sub>2</sub> OTMS).
<u>3</u>	Temps de rétention: 14,35 mn : M/z: 572 (15%; M <sup>+</sup> ); 557 (15%; M-CH <sub>3</sub> ); 469 (100%; M - CH <sub>2</sub> OTMS); 393 (20%); 379 (70%); 289 (40%); 156 (70%).

Confrontant les résultats de cette analyse de *T. roseum* à ceux nouvellement obtenus à partir d'extraits de *B. cinerea* nous avons pu constater qu'en fait 2 était vraisemblablement un artefact obtenu occasionnellement au cours de la chromatographie sur colonne ouverte de résine (*vide supra*). En effet:

- la mycosporine de *B. cinerea*, isolée et purifiée dans ces conditions, a les mêmes propriétés physico-chimiques que celle isolée de *T. roseum*.
- la structure de la mycosporine de *B. cinerea*, isolée antérieurement<sup>4</sup>, correspond bien à la forme cyclisée (RMN-<sup>13</sup>C: nette différence au niveau des C-3 et 4 et absence de NH en RMN-<sup>1</sup>H).
- il ne nous a pas été possible de reproduire cette cyclisation bien que nous utilisions des résines identiques et des extraits bruts obtenus de la même façon à partir de la même souche.

La transformation de 3 en 1 et vraisemblablement de 1 en 2 sont à rapprocher de la séquen-

ce suivante<sup>5</sup>:



En SM (EI), les mycosporines naturelles subissent toujours une déshydratation au niveau de l'OH tertiaire de la cyclohexénone<sup>6</sup>. Dans le cas de 1, une seconde déshydratation conduit à la formation du cycle pyroglutamique, qu'on obtient également à partir de 3 par désamination: on explique ainsi la similitude des spectres de masse de 1, 2 et 3.

Analysant par CLHP des extraits d'*Ascochyta fabae* Speg., nous avons noté la présence d'une mycosporine originale (teneur: 3% du poids sec des spores) présentant une instabilité comparable à celle de 3. Utilisant une technique de purification identique à celle qui nous a permis d'isoler 3 (CLHP préparative sur DOWEX 50W X8, 100-200 mesh) nous avons pu obtenir 60 mg d'un composé auquel nous avons pu attribuer la formule 4.

Au cours de l'hydrolyse de 4 (HCl 0,5N; 90 mm; 100°C) on obtient du glucose (CPG des dérivés TMS) et les composés 5, 3 et 1 puis finalement 1 seul (cinétique suivie par CLHP).

Les déplacements chimiques observés aussi bien en RMN-<sup>13</sup>C (Tableau I) qu'en RMN-<sup>1</sup>H sont en accord avec le squelette hydrocarboné de la mycosporine glutamine réduite et du glucose, la constante de couplage de l'H-1 de ce dernier (J= 3,5 Hz) permettant de lui attribuer la configuration α.

La SM du produit naturel avec une source FAB donne un ion de plus haute masse à m/z: 465 (= MH<sup>+</sup> car on note également les ions MNa<sup>+</sup> et MK<sup>+</sup> à m/z: 487 et 503) alors qu'en D/CI il se situe à m/z: 447 (MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O). L'ion moléculaire observé en EI pour le dérivé TMS correspond à celui du produit déshydraté + 6 TMS (m/z: 878; 15%; C<sub>37</sub>H<sub>78</sub>O<sub>10</sub>N<sub>2</sub>Si<sub>6</sub>), les conditions douces de la réaction (BSTFA + 1% de TMCS à température ambiante) ne permettant pas la silylation de la fonction amide. L'ion important (100%) à m/z: 397 (C<sub>18</sub>H<sub>33</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>) correspond au départ de -CH<sub>2</sub>O-Glucose 4 TMS à partir de M<sup>+</sup>: il permet de situer le glucose sur le CH<sub>2</sub>OH du reste glutaminyle réduit<sup>4</sup>. On observe également sur le spectre la présence de traces de 5 (7 TMS) (m/z: 951 = M - H<sub>2</sub>O + 7 TMS; m/z: 470 = 951 - CH<sub>2</sub>O-Glucose + 4 TMS).

A la suite de ce travail il s'avère que les mycosporines glucosylées principales des espèces d'*A. pisi* et de *Cladosporium herbarum* correspondent à la structure 4; la formule 6 qui leur avait été attribuée précédemment<sup>7</sup> avait été établie à partir de la structure artéfactuelle 2 pour l'aglycone et en l'absence de techniques analytiques rapides pour la séparation (CLHP) et douces pour la SM (Source FAB).

Il est difficile de préciser si les formes acides (1 et 5 pour l'aglycone et le glucoside respectivement), qui représentent jusqu'à 5% de l'absorption à 310 nm, sont natives ou si elles résultent d'une hydrolyse partielle des formes amides correspondantes au cours des manipulations.

Ces résultats mettent en évidence la nécessité d'employer des techniques "douces" pour l'isolement des mycosporines à l'état natif. De plus, ils éclairent d'un jour nouveau le rôle supposé de ces molécules. Ces métabolites secondaires<sup>8</sup> s'accumulent en effet au moment de la différenciation sporale, en mettant "hors circuit" une quantité non négligeable de glutamine. La signification de ce métabolisme reste à préciser.

Spectres de RMN-<sup>1</sup>H de 3 et 5: CAMECA 350 MHz; Pyridine D-5;  $\delta$ : ppm/TMS.

3 - 8,34 (1H; s. large; OH); 7,77 (1H; s. large; OH); 6,84 (2H; massif; NH<sub>2</sub>); 6,80 (1H; d.; J= 9,5 Hz; NH); 6,68 (1H; s. large; OH); 3,90 - 4,10 (5H; massif; CH<sub>2</sub>-9; CH-8; CH<sub>2</sub>-11); 3,82 (3H; s.; OCH<sub>3</sub>); 3,43 (1H; d.; J= 16,8 Hz; CH<sub>2</sub>-6); 3,19 (2H; d.; CH<sub>2</sub>-6; CH<sub>2</sub>-4); 2,99 (1H; d.; J= 16 Hz; CH<sub>2</sub>-4); 2,67 (2H; t.; J= 7 Hz; CH<sub>2</sub>-12); 2,40 (1H; m.; CH<sub>2</sub>-10); 2,23 (1H; m.; CH<sub>2</sub>-10).

4 - 8,26 (1H; s. large; OH); 7,70 (1H; s. large; OH); 6,92 (1H; d.; J= 9,5 Hz; NH); 5,32 (1H; d.; J= 3,44 Hz; Glucose H-1); 4,15 - 4,60 (8H; massifs; CH-8; CH<sub>2</sub>-9; et 5H du glucose); 4,00 (1H; d.; J= 10,8 Hz; CH<sub>2</sub>-11); 3,93 (1H; d.; J= 10,8 Hz; CH<sub>2</sub>-11); 3,89 (3H; s.; OCH<sub>3</sub>); 3,69 (1H; m.; H du glucose); 3,51 (1H; d.; J= 16,8 Hz; CH<sub>2</sub>-6); 3,16 (1H; d.; J= 15,9 Hz; CH<sub>2</sub>-4); 3,13 (1H; d.; J= 16,8 Hz; CH<sub>2</sub>-6); 2,97 (1H; d.; J= 15,9 Hz; CH<sub>2</sub>-4); 2,59 (2H; t.; J= 6,9 Hz; CH<sub>2</sub>-12); 2,25 (1H; m.; CH<sub>2</sub>-10); 2,16 (1H; m.; CH<sub>2</sub>-10).

#### Remerciements

Nous remercions M. HARDY (Sté NERMAG) pour l'enregistrement des spectres de masse en D/CI et pour les couplages CLHP-SM et M. FRAISSE (Service Central d'Analyse du CNRS) pour ceux obtenus avec la source FAB (Spectromètre ZAB-VG).

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1) N. ARPIN et M.-L. BOUILLANT, *in* The Fungal Spore, Ed. G. TURIAN et R.H. HOHL, Academic Press pp. 435-454 (1981).
- 2) N. ARPIN, S. THIVEND et J. FAVRE-BONVIN, Bull. Soc. Myc. France, 93, 39-52 (1977).
- 3) J. FAYRET, J. BERNILLON, M.-L. BOUILLANT, J. FAVRE-BONVIN et N. ARPIN, Phytochemistry, 12, 2709-10 (1981).
- 4) N. ARPIN, J. FAVRE-BONVIN et S. THIVEND, Tetrahedron Letters, 10, 819-20 (1977).
- 5) M. JAVILLIER, J. POLONSKI, M. FLORKIN, P. BOULANGER, M. LEMOIGNE, J. ROCHE et R. WURMSER, Biochimie Générale, 1, fasc. 1, 538-9, MASSON Ed. (1959).
- 6) J. FAVRE-BONVIN, N. ARPIN et C. BREVARD, Can. J. Chem., 54, 1105-13 (1976).
- 7) M.-L. BOUILLANT, J.-L. PITTET, J. BERNILLON, J. FAVRE-BONVIN et N. ARPIN, Phytochemistry, 12, 2705-7 (1981).
- 8) J.-L. PITTET, B. BOURGUIGNON et N. ARPIN, *Physiol. Plant.*, sous presse.

(Received in France 28 October 1982)