

STRUCTURES ET STEREOCHIMIE DES SESQUITERPENES DE *PENICILLIUM ROQUEFORTI* PR TOXINE ET EREMOFORTINES A, B, C, D, E

S. MOREAU et J. BIGUET

I.N.S.E.R.M. U.42, 369 rue Jules Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

A. LABLACHE-COMBIER

Laboratoire de Chimie Organique Physique, E.R.A. C.N.R.S. n° 827, Laboratoire Associé à l'E.N.S.C.L.,
Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

et

F. BAERT, M. FOULON et C. DELFOSSE

Laboratoire de Physique des Solides, Equipe de Dynamique des Cristaux Moléculaires Associée au C.N.R.S.
(N° 465), Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

(Received in France 7 December 1979)

Abstract—Sesquiterpenoids elaborated by *Penicillium roqueforti* PR Toxin (PRT), eremofortin A, B, C, D (EA, EB, EC, ED), have been studied by ^1H NMR and ^{13}C NMR. The structure of a new metabolite eremofortin E (EE) has been established by X-ray diffraction. The absolute stereochemistry of all metabolites has been determined by comparison with the absolute configuration of PRT (determined by X-ray anomalous dispersion) using rotatory dispersion and circular dichroism curves. The sesquiterpenoids of *P. roqueforti* belong to the eremophilane series with the unusual 7α side chain.

Résumé— Une étude structurale complète des métabolites sesquiterpéniques élaborés par *Penicillium roqueforti* la PR Toxine (PRT), les éremofortines A, B, C, D (EA, EB, EC, ED) utilise RMN ^1H et RMN ^{13}C . La structure d'un nouveau métabolite l'éremofortine E (EE) a été confirmée par diffraction de rayons. La stéréochimie absolue de la série a été obtenue par comparaison avec la configuration de PRT (déterminée par diffusion anormale de rayons X) grâce aux courbes de dispersion rotatoire et de dichroïsme circulaire. Les sesquiterpènes de *P. roqueforti* appartiennent à la série éremophilane possédant la chaîne latérale 7α inhabituelle.

Penicillium roqueforti est l'espèce fongique utilisée dans l'affinage du fromage de Roquefort et de divers autres types de bleu. Ru Dong Wei^{1,2} a isolé du milieu de culture de *P. roqueforti* une toxine de structure sesquiterpénique: la PR Toxine (PRT). D'autres auteurs^{3,4} ont isolé du mycélium de ce champignon des alcaloïdes du type indolique. Nous avons pour notre part isolé 4 nouveaux sesquiterpènes du milieu de culture de ce champignon^{5,6} (Schéma 1). Nous avons montré, grâce à ces métabolites sesquiterpéniques de structure très proche de la PR Toxine, que la toxicité et les propriétés biochimiques de la PR Toxine (inhibition de la synthèse des protéines) étaient dues principalement à la fonction aldéhyde présente sur ce métabolite.⁷ Nous présentons dans ce travail les données structurales complètes des Eremofortines A, B, C, D, l'isolement d'un nouveau métabolite, l'Eremofortine E, et une étude stéréochimique complète de la série.

Structures de l'éremofortine et de la PR imine

L'Eremofortine E EE a été isolée du milieu d'une culture de la souche répertoriée NRRL 849 (productrice de PRT). Au cours de cette culture nous n'avons pas retrouvé PRT, mais deux métabolites que nous avons purifiés par chromatographie sur silice par élution de mélanges chloroforme-méthanol. La cristallisation d'une fraction homogène en CCM permet d'isoler EE (90 mg). Une fraction plus polaire

soumise à la cristallisation dans l'éther permet d'isoler un métabolite déjà connu, la PR imine² (140 mg).

La PR imine dont la structure a été étudiée par Wei² résulte de la réaction de l'hydroxyde d'ammonium en solution méthanolique sur PRT. Le métabolite "naturel" obtenu précédemment s'avère en tous points semblable au composé de synthèse: comportement en CCM, point de fusion, point de fusion de mélange, pouvoir rotatoire, dichroïsme circulaire, RMN du proton.

Structure de EE. La structure proposée repose sur les données spectroscopiques. La faible quantité disponible ne permettant pas de confirmations chimiques, nous avons confirmé la structure par une étude en diffraction de rayons X (Fig. 1).

Le remplacement de la fonction aldéhyde de PRT par une fonction amide dans EE repose sur les données suivantes: (a) en RMN du proton (60 MHz), le proton aldéhydique à 9 ppm disparaît. On voit apparaître deux massifs (1-H d'intensité) à 5,6 et 6,1 ppm échangeables avec D_2O que l'on attribue à NH_2 ; (b) le spectre RMN du ^{13}C (15,08 MHz) très proche de celui de PRT présente un singulet à 172,6 ppm caractéristique de la fonction amide; (c) le spectre I.R. (KBr) présente des bandes NH (3480 cm^{-1} fine et 3160 large et multiple). La région des carbonyles est très riche, 1735 cm^{-1} (CO acétate), 1710 cm^{-1} (amide libre), 1680 cm^{-1} (CO conjugué), 1665 cm^{-1} (amide lié), 1620 cm^{-1} (double liaison conjuguée).

Metabolites de *Penicillium roqueforti*

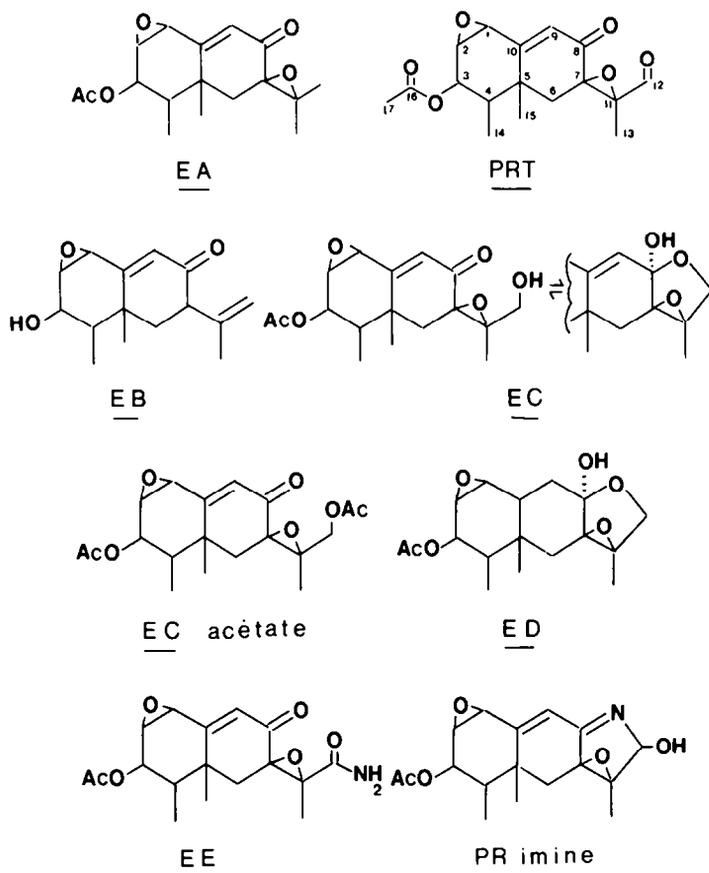
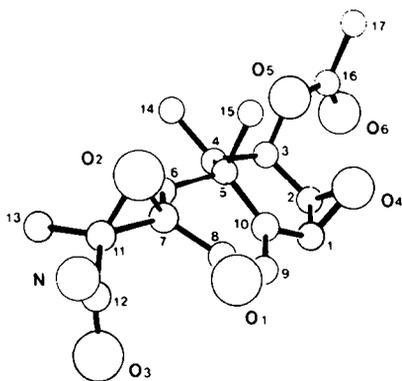


Schéma 1.

L'analyse en spectrométrie de masse ne permet pas de détecter la présence de l'azote. Le pic à m/e 318 correspond à $M^- - 17$ (NH_3). La mesure en haute résolution donne pour $M^+ - 17$ 318, 1109 (calculé pour $C_{17}H_{18}O_6$ 318, 1103).

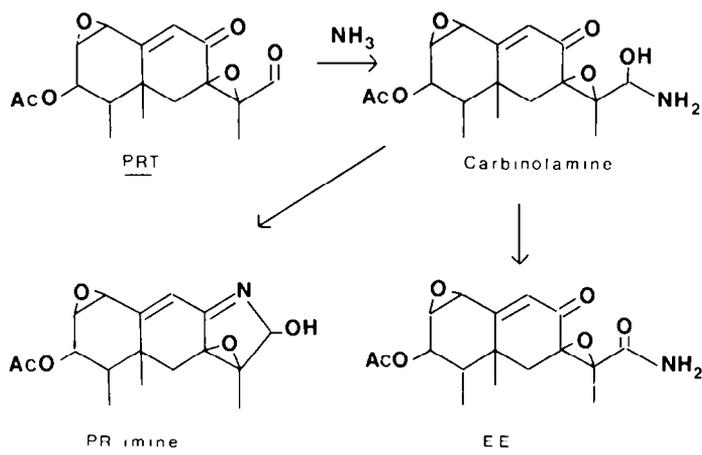
L'analyse ou diffraction de rayons X a été obtenue à partir d'un monocristal (méthanol). L'enregistrement de 1139 réflexions a été réalisée au diffractomètre automatique équipé d'une cathode au cuivre. La structure a été résolue par la méthode directe en utilisant le programme Multan.⁸ La valeur finale du coefficient de véracité est $R = 4.31\%$. La maille est monoclinique. Ses paramètres sont $a = 13,529 \text{ \AA}$; $b = 8,016 \text{ \AA}$; $c = 7,9 \text{ \AA}$ et $\beta = 102,91^\circ$. Le groupe spatial est $P2_1$. Les Tableaux 1a, b, c indiquent les coordonnées fractionnaires, des atomes lourds, les longueurs de liaison et les angles.

La présence dans une même culture de ces deux composés azotés pose le problème de leur origine naturelle. En effet, cette expérience n'a jamais pu être reproduite. Il s'agit probablement d'une modification du milieu de culture au cours d'une stérilisation à l'autoclave. L'identité chimique et stéréochimique des PR imine naturelle et synthétique, permet de penser que ces deux métabolites sont élaborées de la même manière: une réaction chimique d'ion ammonium sur la fonction aldéhyde de *PRT*. Cette réaction se serait produite dans le milieu de culture pour la PR imine naturelle. Néanmoins, *EE* qui apparaît simultanément provient plus probablement d'une métabolisation par le champignon. Nous proposons un schéma de



Eremofortine E

Fig. 1. Stéréochimie de *EE* obtenue par diffraction de rayons X.

Schéma 2. Schéma de biosynthèse hypothétique de *EE* et *PR* imine

synthèse de ces deux métabolites (Schéma 2). *EE* pourrait être formée par oxydation par un alcool déhydrogénase de la carbinolamine intermédiaire de la réaction de NH₃ sur la *PRT* (biosynthétisée normalement par le champignon). NH₃ provenant d'une altération du milieu de culture. Nous avons cherché à vérifier ce schéma par addition de sulfate d'ammonium dans le milieu de culture. Nous n'avons jamais pu résoudre ce métabolite, seul est présente la *PR* imine dans ces conditions.

Comparaisons structurales et stéréochimie des sesquiterpènes

La démonstration des structures *EA*, *EB*, *EC*, *ED* a déjà fait l'objet de publications.^{5,6} La structure de *ED* a été confirmée par diffraction de rayons X,⁹ donnant ainsi accès à la stéréochimie relative de cette série. Le Tableau 2 rassemble les données de RMN du proton de la série. Les valeurs des déplacements chimiques attribués aux divers protons ont été confirmées chaque fois que nécessaire par des expériences de double irradiation. Sur *EA*, le multiplet à $\delta = 1.79$ ppm (H-4)

devient par irradiation du CH₃ 14 ($\delta = 1.01$) un doublet ($J = 5$ Hz), résultant du couplage H-3, H-4. Dans le cas de *ED*, l'irradiation du doublet à $\delta = 1.39$ ppm (H-6_A) transforme le doublet à $\delta = 1.80$ en singulet (H-6_B). La Figure 2 donne l'exemple du spectre de *EB* mesuré à 200 MHz. Les divers protons se distinguent aisément. Seuls les protons H-6 donnent un ensemble de pics peu analysables. Le proton en H-7 ($\delta = 3.26$) se présente sous la forme d'un doublet de doublet ($J_1 = 14$ Hz, $J_2 = 5$ Hz) indiquant que ce proton est en position axiale, couplé aux protons H-6 par une constante J_{ax} et J_{eq} . Le méthyle C-13 est couplé à longue distance aux protons vinyliques en 12 ($J_{cis} + J_{trans} = 2.2$ Hz).

L'attribution des signaux des méthyles tertiaires C-15, C-13, C-12 résulte des comparaisons de l'ensemble des composés et des données de la littérature.²

Les données des spectres de carbone 13 sont rassemblées dans le Tableau 3. Les déplacements chimiques observés pour les carbones des groupements fonctionnels: cétone α,β éthylnique, aldéhyde, amide, imine α,β éthylnique, acétate double liaison,

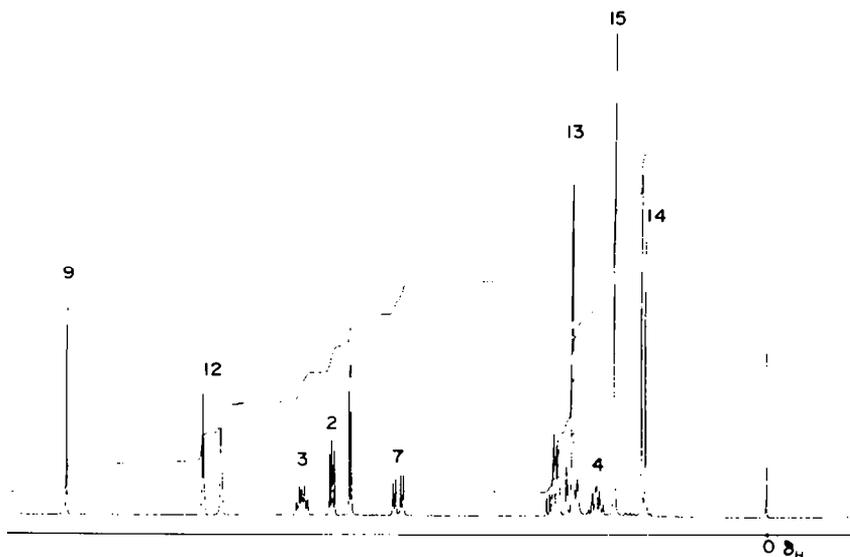
Fig. 2. Spectre RMN ¹H de *EB* (200 MHz).

Tableau 1. Tableau des coordonnées fractionnaires pour les atomes lourds ($\times 10^4$)

	x	y	z
N	1171	6958	370
C-1	1521	404	6494
C-2	2108	1966	6799
C-5	2918	2322	5784
C-4	2805	1260	4148
C-5	2613	636	4383
C-6	3716	4201	8481
C-7	1904	3155	2495
C-8	1314	3571	3860
C-9	1081	2166	4890
C-10	1702	850	5216
C-11	1661	4073	827
C-12	844	5107	495
C-13	1796	3279	826
C-14	844	5407	495
C-15	3544	1564	5448
C-16	4232	3063	8203
C-17	4773	2391	0671
O-1	1061	5007	4077
O-2	2564	4488	2136
O-3	56	5022	219
O-4	2357	0621	8030
O-5	3933	2028	6878
O-6	3716	4201	8481

(b) Longueur des liaisons en Å

C-(1) - C-(2)	1,47
C-(1) - C-(10)	1,49
C-(1) - C-(4)	1,47
C-(2) - C-(3)	1,52
C-(2) - C-(4)	1,44
C-(3) - C-(4)	1,53
C-(3) - O-(5)	1,47
C-(4) - C-(5)	1,56
C-(4) - C-(4)	1,54
C-(5) - C-(6)	1,56
C-(5) - C-(15)	1,54
C-(6) - C-(7)	1,51
C-(7) - C-(8)	1,52
C-(7) - C-(11)	1,48
C-(7) - O-(2)	1,46
C-(8) - C-(9)	1,47
C-(8) - O-(1)	1,22
C-(9) - C-(10)	1,34
C-(11) - C-(12)	1,52
C-(11) - C-(13)	1,50
C-(11) - O-(2)	1,45
C-(12) - N	1,33
C-(12) - O-(3)	1,23
C-(16) - C-(17)	1,48
C-(16) - O-(5)	1,33
C-(16) - O-(6)	1,20

(c) Angle des liaisons

C(1) - C(2) - C(3)	119,8
C(1) - C(2) - O(4)	60,7
C(1) - C(10) - C(9)	118,3
C(1) - O(4) - C(2)	60,6
C(2) - C(3) - O(5)	110,2
C(2) - C(3) - C(4)	113,3
C(3) - O(5) - C(16)	116,4
C(2) - C(1) - O(4)	58,6
C(4) - C(5) - C(15)	113,4
C(4) - C(5) - C(6)	106,3
C(5) - C(4) - C(3)	115,4
C(5) - C(4) - C(14)	114,5
C(5) - C(10) - C(9)	122,4
C(5) - C(10) - C(1)	119,3
C(5) - C(6) - C(7)	113,5
C(6) - C(7) - O(2)	117,2
C(6) - C(5) - C(15)	110,2
C(7) - C(3) - O(1)	121,0
C(7) - C(11) - O(2)	59,6
C(8) - C(7) - O(2)	114,8
C(8) - C(7) - C(6)	115,7
C(9) - C(8) - O(1)	122,9
C(9) - C(8) - C(7)	116,2
C(10) - C(9) - C(8)	120,7
C(10) - C(5) - C(15)	110,4
C(10) - C(5) - C(6)	106,9
C(10) - C(5) - C(4)	109,4
C(10) - C(1) - O(4)	115,5
C(10) - C(1) - C(2)	121,5
C(11) - C(7) - O(2)	59,2
C(11) - C(2) - C(7)	61,2
C(11) - C(7) - C(6)	119,2
C(11) - C(7) - C(8)	118,6
C(11) - C(12) - O(3)	120,6
C(11) - C(12) - N	115,5
C(12) - C(11) - O(2)	115,2
C(12) - C(11) - C(7)	120,8
C(13) - C(11) - O(2)	118,2
C(13) - C(11) - C(7)	121,5
C(13) - C(11) - C(12)	111,9
C(16) - O(5) - O(6)	110,2
C(16) - O(6) - O(5)	116,4
C(16) - O(6) - O(5)	122,3

Tableau 2 Valeurs des déplacements chimiques en RMN ¹H (en ppm. référence TMS)

Composés	H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
EA	*	3,77	3,9	5,12	1,79	1,92 2,12				6,25			1,32	1,40	1,01	1,52		2,15
PRT	***	3,65	3,96	5,16	1,79	1,81 2,16				6,43			9,75	1,49	1,03	1,45		2,16
EB	*	3,69	3,85	4,12	1,52		3,26			6,20			4,84	1,72	1,09	1,36		
EC Acet.	*****	3,72	4,00	5,25						6,55			4,6	1,4	1,07	1,47		
ED	**	3,16	3,46	5,24	1,65	1,36 1,80							3,83	1,45	0,92	1,18		2,12
EE	*****	3,6	3,9	5,12						6,35			5,6	1,60	1,0	1,32		
PR imine	***	3,7	3,8	5,20						6,7			5,4	1,62	1,0	1,35		

* : 250 MHz

** : Référence 2

*** : 60 MHz

Tableau 3. Valeurs des déplacements chimiques en RMN ¹³C (en ppm. Référence TMS)

Composés	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
EA	55,9	55,2	69,9	42	37,2	42,1	62,4 64,6	193,8	131,5	160,78	62,4 64,8	19,5 22,5	19,5	10,4	21,7	170,7	20,7	
PRT	55,9	55,5	69,9	42,8	38,2	41,6	67,4	191,7	130	164,7	67,4	198,7	13,6	10,1	21,9	170,7	20,7	
EB	58,2 ou 57,9	68,2	45,7	36,9	42,4	50,5		197,7	129,7	160,6	142,9	114,7	18,8	9,9	20,1			
EC Acet.	55,9	55,2	69,9	42,5	37,3	41,8	61,9	192,8	131,3	161,2	64,1	65,3	16,3	10,4	22,6	170,7	20,7	
ED	57,6	50,2	71,3	41,7	38,4	35,6	61,1	101,9	34,3	43,9	68,4	69,7	11,3	9,7	15,5	171	20,8	
				ou 43,9	ou 34,3	ou 68,4			ou 35,6	ou 41,7	ou 61,1							
EE	55,9	55,2	69,9	42,5	37,5	40,9	63,2	190,6	130,6	162,9	64,7	172,6	16,6	10,2	22,2	170,7	20,7	
							ou 64,7			ou 63,2								
PR imine	56,8	54,9	70,4	42,7	38,5	36,2	67,8	157,8	124,7	157,8	72,1	93,8	10,3	10,3	21,6	170,7	20,7	
				ou 72,1	ou 72,1	ou 72,1			ou 67,8	ou 67,8	ou 67,8							

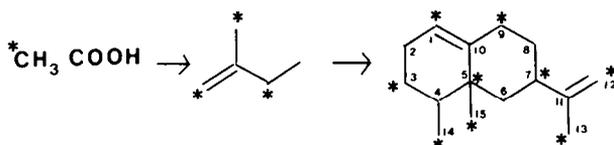


Schéma 3. Incorporation de l'acétate de sodium dans le squelette éremophilane.

hémi-acétal, époxydes, alcool sont tout à fait caractéristiques. Les signaux C-1, C-2 et C-7, C-11 (époxydes) sont différenciables par leur multiplicité en découplage off résonance. Néanmoins, il est impossible de choisir sur cette base entre les signaux C-1 et C-2. L'attribution des déplacements chimiques des méthyles C-14, C-15, C-12 et C-13 repose principalement sur la comparaison des valeurs obtenues pour toute la série. Le signal à champ haut est attribué au C-14 dont l'environnement est très semblable dans toute la série. Nous avons attribué des valeurs déterminées aux divers carbones C-1, C-2, C-12, C-13, C-15. Ces attributions reposent sur des expériences d'incorporation de carbone-13.

La nature sesquiterpénique du squelette carboné de ces molécules permet de prédire sur ce squelette le mode d'incorporation d'un précurseur des terpènes: l'acétate de sodium. L'incorporation biologique d'acétate de sodium enrichi en ^{13}C sur le C-2 se traduit dans le spectre RMN ^{13}C du terpène envisagé par une augmentation du signal des carbones provenant du C-2 enrichi. Le schéma 3 indique le mode de synthèse d'un squelette éremophilane à partir de l'acétate. L'augmentation de l'intensité du signal à $\delta = 55,9$ de *PRT* permet de dire que ce signal correspond au C-1 de *PRT*. Une étude réalisée avec de l'acétate de sodium enrichi en ^{13}C sur les deux carbones C-1 et C-2 permet de déterminer sans ambiguïté que le pic à $\delta = 21,9$ correspond au C-15 de *PRT* (Ref. 10 et Moreau résultats non publiés). Le signal à $\delta = 13,6$ de *PRT* a donc été attribué au C-13 du squelette (attribution

inverse de la Ref. 2). Pour les autres métabolites, les valeurs ont été attribuées par comparaison.

Stereochimie

La stéréochimie relative de ces métabolites est déduite des structures obtenues par diffraction de rayons X sur *PRT*, *ED* et *EE*. Elle est celle indiquée sur les Fig. 1 et 3. Les méthyles C-14 et C-15, les divers époxydes sont en *cis*. La fonction en 3 est axiale. La stéréochimie absolue n'a jamais été précisée.

Les courbes de dispersion rotatoire (Fig. 4) montrent toutes un effet Cotton positif net pour la transition $n - \pi^*$ des systèmes cétones α, β -insaturés. Il est permis d'affirmer que la configuration absolue de l'ensemble de ces métabolites est identique.

La complexité des vagues de dichroïsme de ces métabolites (Fig. 5) est le reflet de la présence de nombreux groupements fonctionnels conjugués (cétones α, β éthyléniques conjuguées selon les cas à 1 ou 2 époxydes, ou cétones α, β éthyléniques présentant également en β, γ une double liaison). La règle des octants proposée par Sneath¹¹ pour les cétones α, β insaturées ne nous paraît pas applicable dans ce cas. La comparaison des courbes de dichroïsme montre que les vagues sont très différentes selon la présence ou l'absence de l'époxyde 7-11 (comparaison entre les courbes *EA*, *PRT*, *EC*, *EE* d'une part et *EB* d'autre part). Tous les composés possédant la fonction époxyde montre un effet dichroïque nettement positif associé à la bande R. Par contre, *EB* possédant une double liaison en β, γ du carbonyle conjugué montre

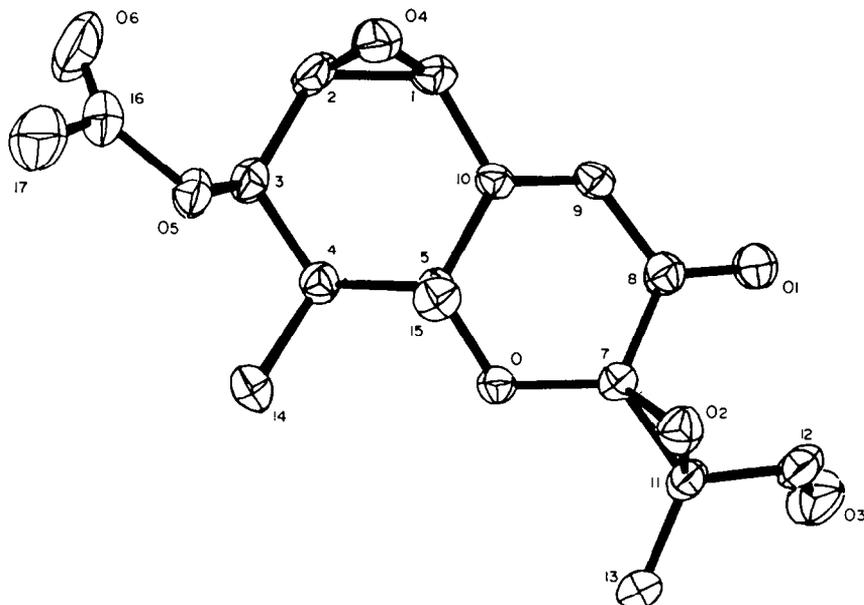


Fig. 3. Configuration absolue de *PRT* obtenue par diffraction de R.X.

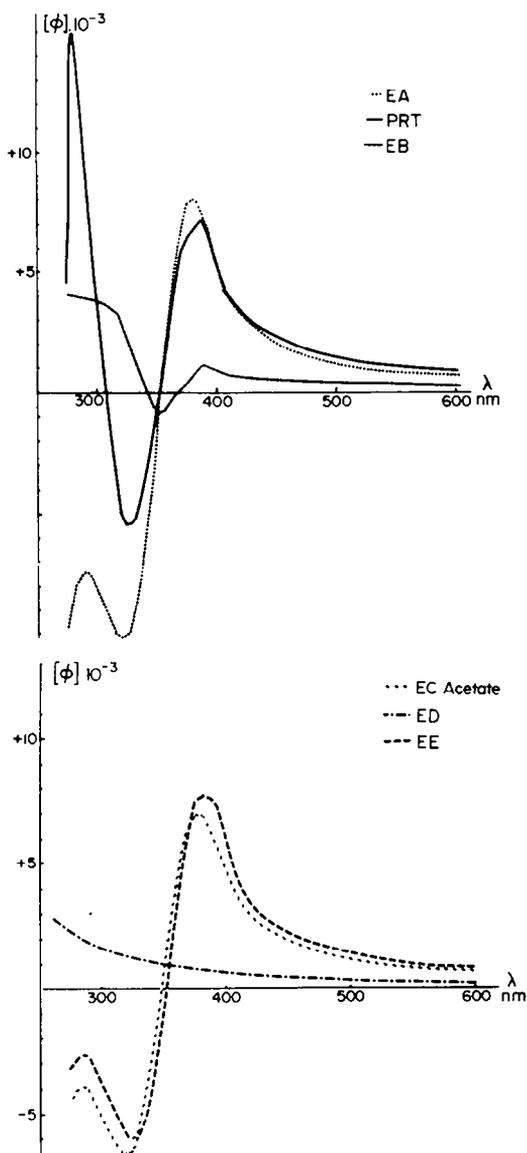


Fig. 4. Courbes de dispersion rotatoire.

dans cette même région un effet dichroïque multiple d'amplitude faible difficile à interpréter et qui pourrait résulter d'interactions électroniques entre la cétone insaturée et la double liaison en β,γ .¹² Cet effet serait moins sensible en dispersion rotatoire (existence d'inflexions aux environs de 370 nm).

Nous avons cherché à déterminer la configuration absolue de ces métabolites par diffraction de rayons X sur *PRT*. L'obtention d'un dérivé cristallisé possédant en 3 une fonction p. bromobenzoate s'est avérée impossible. Nous nous sommes alors orientés vers la détermination directe par diffusion anormale de l'oxygène sur *PRT*. Cette étude fera l'objet d'un article complet.¹³ La structure absolue est celle indiquée sur la Fig. 3. Elle correspond à la série éremophilane¹⁴ dans laquelle les méthyles C-14 et C-15 sont cis et β . La configuration de la chaîne en 7 peut être α ou β . (La configuration 7β est de loin la plus fréquente).

La présence de la fonction époxyde C-7 C-11 de configuration β sur *PRT* et *EA*, *EC*, *ED*, *EE* ne permet pas de définir exactement si les sesquiterpènes de *P. roqueforti* appartiennent à la série 7α ou 7β . La biosynthèse d'un époxyde est effectuée à partir de la double liaison correspondante. La stéréochimie en 7 à ce niveau n'est donc que le reflet de la stéréochimie de l'introduction de l'époxyde. De même, la présence en 7 d'un carbone sp^2 ne permet pas de choisir. *EB* possède la chaîne isopropényle en 7 et est pour cela très certainement un précurseur biogénétique des autres Éremofortines. La configuration en 7 de ce composé est donc importante pour choisir entre la série éremophilane 7β et la série épimère en 7 (Fig. 6).

L'examen des courbes de dispersion rotatoire et de dichroïsme de *EB* ne permet pas de choisir entre ces deux possibilités.

L'examen des modèles de Dreiding montre que, dans le cas d'une chaîne α , le proton en 7 est β axial en interaction 1,3 diaxiale avec le méthyle C-15. L'autre configuration ne montre bien sûr aucun effet de ce type. Nous nous sommes orientés vers l'étude de cette interaction par mesure de l'effet Overhauser. Le spectre à 200 MHz de *EB* montre que ces signaux sont bien distincts (Fig. 2).

L'irradiation en CH_3 -15 provoque une augmentation de 20%, du signal H-7. Par comparaison,

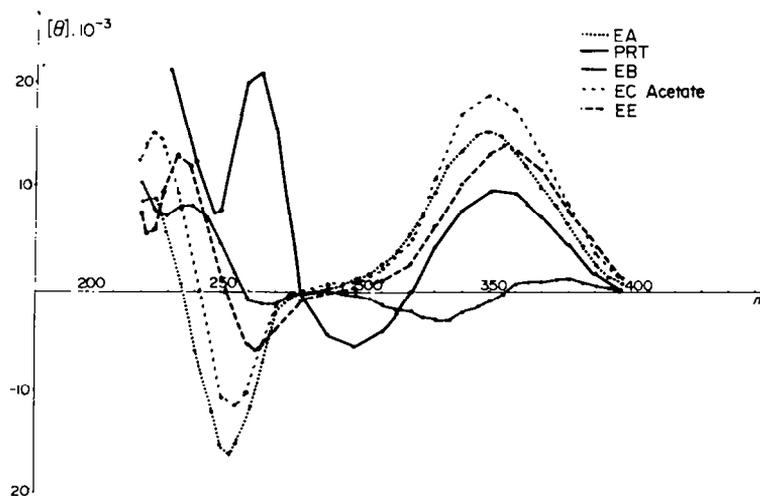


Fig. 5. Courbes de dichroïsme circulaire.

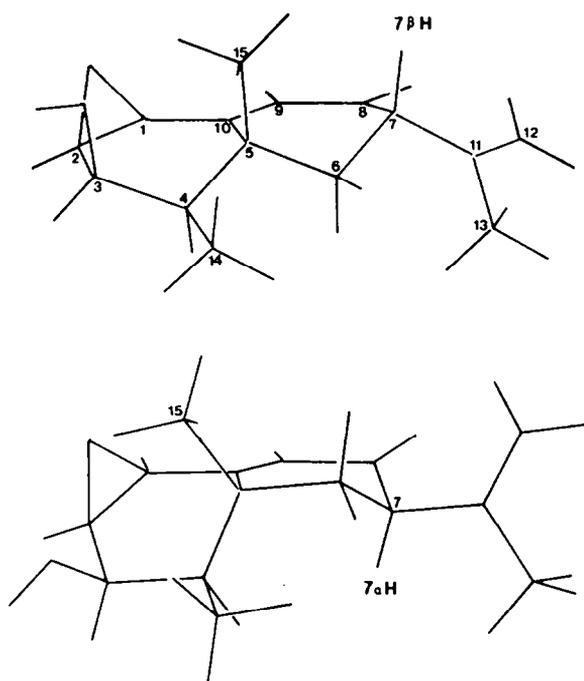


Fig. 6. Configurations en 7 de EB.

l'irradiation en CH₃-14 ou CH₃-15 ou à $\delta = 0,5$ ppm ne provoque aucune augmentation du signal observé (Tableau 4). Cet effet Overhauser très net permet de penser que la chaîne latérale en 7 est α .

Les sesquiterpènes de *P. roqueforti* appartiennent donc à la série éremophilane 7α peu fréquente mais série caractéristique des métabolites isolés des divisions inférieures du règne végétal (champignon, hépatique ltc)^{15,16} les sesquiterpènes isolés des plantes supérieures étant de la série 7β .¹⁷

La phoménone isolée du champignon *Phoma exigua*¹⁸ est un sesquiterpène de squelette éremophilane qui présente une configuration β des méthyles C-14 et C-15 et β de la chaîne latérale en 7. Mais il faut remarquer également que la géométrie en 7 ne correspond pas obligatoirement à la géométrie originelle du squelette en raison de la présence en 6,7 d'un époxyde.

Il faut remarquer que tous les métabolites sesquiterpéniques actuellement isolés de *P. roqueforti* possèdent un époxyde en 1-2. Nous n'avons pu, malgré de nombreuses tentatives, isoler d'autres métabolites.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres IR ont été mesurés en solution dans le chloroforme ou en pastille de KBr sur un appareil Perkin-Elmer 477. Les spectres UV ont été enregistrés sur un appareil Cary 118c ou Beckman modèle 24. Les rotations spécifiques ont été mesurées sur un polarimètre Perkin-Elmer 141, les dispersions rotatoires sur un spectropolarimètre Fica spectropol 1. Les mesures de dichroïsme circulaire ont été prises en solutions dans le chloroforme (cellule 0,01 cm) sur un dichrographe Jobin-Yvon RJ Mark III. Les spectres RMN de ¹H ont été enregistrés sur appareils Varian A.60 (60 MHz), Caméca (250 MHz). L'effet Overhauser a été mesuré sur un appareil Varian XL 200, l'échantillon (5 mg) préparé dans le chloroforme en tubes scellés, le découplage a été réalisé en temps partagé en irradiant pour 30 secondes les pics envisagés. Les spectres RMN du ¹³C ont été mesurés en solution dans le chloroforme sur spectrographes Brücker HX 90 (25,18 MHz) et WP 60 (15,08 MHz). Les spectres de masse (SM) ont été enregistrés sur appareil AEI MS 12 (basse résolution) et MS 9 (haute résolution) au laboratoire de Chimie Appliquée de l'Université de Bordeaux I, Bordeaux, France. Les microanalyses ont été effectuées par le Service Central de Micronalyse du C.N.R.S. de Thiais, France. La souche de *Penicillium roqueforti* NRRL 849 nous a été fournie par le Northern Regional Research Center (Peoria, U.S.A.). La souche B utilisée pour l'affinage de fromages de type bleu d'Auvergne nous a été aimablement fournie par le Dr. M. Jemmali, I.N.R.A., Paris, France. Les souches sont clonées au micromanipulateur et conservées en tubes inclinés sur Potatoes Destrose Agar (PDA DIFCO). Le milieu de culture contient 20 g/l d'extrait de levure et 150 g/l de saccharose dans de l'eau déminéralisée. Ce milieu est versé dans des fioles de Roux à raison de 100 ml par fiole et stérilisé à l'autoclave à 110° pendant 20 minutes. Une suspension de spores est réalisée et on ensemence environ 10⁶ à 10⁸ spores par fioles. Les fioles sont incubées pendant 12-14 jours à 25° en cultures stationnaires à l'obscurité. Le milieu de culture est filtré, puis extrait au chloroforme dans une ampoule à décanter. L'extrait est concentré à l'évaporateur rotatif à 50° et conservé à -20°C avant purification.

Les chromatographies sur couches minces (CCM) sont réalisées avec du gel de silice Merck, et éluées par des mélanges chloroforme méthanol en proportions variables (de 2-5% en méthanol). Les plaques sont révélées par pulvérisation d'acide sulfurique concentré, examinées sous UV à 365 nm, puis chauffées à 120° pendant 10 minutes. Les chromatographies sur colonnes ont été effectuées sur gel de silice Merck (0,05-0,2 mm).

Éremofortine A, B, C, D et PRT

Nous disposons d'une souche de *P. roqueforti* utilisée pour l'affinage de fromages de type bleu d'Auvergne. Des spores de cette souche sont ensemencées des fioles de Roux sur un milieu semi-synthétique contenant du saccharose et de l'extrait de levure. Après 12 à 14 jours de culture, le milieu de culture est récolté et extrait au chloroforme.

Tableau 4. Effet Oberhauser sur EB

Irradiation	Intégrale H-3	Intégrale H-7	H-7/H-3
δ 1,72 C-13	81,48	84,83	1,04
δ 1,36 C-15	82,41	99,86	1,21
δ 1,09 C-14	85,5	84,89	0,99
δ 0,5	86,6	82,56	0,95

L'extrait chloroformique huileux de 100 fioles (~3,5 g) est analysé par CCM. La révélation à l'acide sulfurique permet de montrer la présence de 5 taches principales qui sont dans l'ordre de polarité croissante: l'Erémofortine A EA, la PR Toxine PRT, l'Erémofortine B EB, l'Erémofortine C EC et l'Erémofortine D ED. Une chromatographie sur colonne de silice éluee par ces mélanges chloroforme-méthanol de 0,5% 10% en méthanol permet d'isoler des fractions enrichies en ces diverses taches. Ces fractions sont ensuite soumises séparément à une nouvelle chromatographie sur silice avec un gradient de chloroforme-méthanol plus progressif. On obtient finalement 5 fractions correspondant aux 5 taches observées en C.C.M. Des cristallisations effectuées dans des solvants appropriés permettent d'isoler environ EA 70 mg, PRT 150 mg, EB 90 mg, EC 30 mg, ED 70 mg.

Incorporation biologique de $^{13}\text{C}_3\text{-COONa}$

5 Fioles de culture de la souche NRRL 849 sont utilisées. L'acétate de sodium ^{13}C -e (500 mg enrichissement 90%) est additionné stérilement en solution aqueuse au 3ème et 6ème jour de culture. La culture est extraite au 14ème jour. On récupère 40 mg de PRT cristallisée.

Erémofortine A EA. Cristaux blancs (éther éthylique). F 159 161°; $[\alpha]_D^{20} + 205^\circ$ (c = 0,9, CHCl_3). SM *m/e* 306 (M^+), 277, 246, 231, 218, 206, 177, 159, 149; SM haute résolution M^+ 306, 14663 (calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$, 306, 14671). UV (CHCl_3) λ_{max} 246 nm (ϵ 14700). IR (KBr) 1740, 1670, 1620 et 1240 cm^{-1} . RMN ^1H (250 MHz): δ ppm 1.01 (3 H, d, J = 7 Hz, CH_3 -14); 1.32 (3 H, s, CH_3 -12); 1.40 (3 H, s, CH_3 -13); 1.52 (3 H, s, CH_3 -15); 1.79 (1 H, qd, $J_1 = 7$ Hz, $J_2 = 5$ Hz, H-4); 1.92 (1 H, d, J = 15 Hz, H-6_A); 2.14 (1 H, d, J = 15 Hz, H-6_B); 2.15 (3 H, s, CH_3 -COO); 3.77 (1 H, d, J = 3,5 Hz, H-1); 3.9 (1 H, dd, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz, H-2); 5.12 (1 H, t, J = 5 Hz, H-3); 6.25 (1 H, s, H-9). RMN ^{13}C (25,2 MHz): δ ppm (référence TMS) C-1, 55,9 (d); C-2 55,2 (d); C-3 69,9 (d); C-4, 42 (d); C-5, 37,2 (s); C-6, 42,1 (t); C-7, 62,4 ou 64,6 (s); C-8, 193,8 (s); C-9, 131,5 (d); C-10, 160,7 (s); C-11, 62,4 ou 64,6 (s); C-12, 22,9 (q); C-13, 19,5 (q); C-14, 10,4 (q); C-15, 21,7 (q); C-16, 170,7 (s); C-17, 20,7 (q).

Erémofortine B EB. Cristaux incolores (éther éthylique) F 121 123°; $[\alpha]_D^{15} + 115^\circ$ (c = 0,9, CHCl_3). SM *m/e* 248 (M^+), 233, 190, 180, 151. UV (CHCl_3) λ_{max} 249 nm (ϵ 15800). IR (KBr) 3520, 1670 et 1620 cm^{-1} . RMN ^1H (250 MHz): δ ppm, 1.09 (3 H, d, J = 7 Hz, CH_3 -14); 1.36 (3 H, s, CH_3 -15); 1.52 (1 H, qd, $J_1 = 7$ Hz, $J_2 = 5$ Hz, H-4); 1.72 (3 H, d, $J_1 + J_2 = 2,2$ Hz); 2 (1 H, échangeable avec D_2O O-H); 3.26 (1 H, d, $J_1 = 14$ Hz, $J_2 = 5$ Hz, H-7); 3.69 (1 H, d, $J = 3,5$ Hz, H-1); 3.85 (1 H, d, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz, H-2); 4.12 (1 H, m, H-3); 4.84 (1 H, m, H-12); 5 (1 H, m, H-12); 6.2 (1 H, s, H-9). RMN ^{13}C (25,2 MHz): δ ppm (TMS) C-1, 58,2 ou 57,9 (d); C-2, 58,2 ou 57,9 (d); C-3, 68,2 (d); C-4, 45,7 (d); C-5, 36,9 (s); C-6, 42,4 (t); C-7, 50,5 (d); C-8, 197,7 (s); C-9, 131,3 (d); C-10, 161,2 (s); C-11, 142,9 (s); C-12, 114,7 (t); C-13, 18,8 (q); C-14, 9,9 (q); C-15, 20,1 (q). Analyse $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ calc. C, 72,55; H, 8,12. Trouvé C, 72,53; H, 8,06%.

Erémofortine C EC. Voir référence 6.

Erémofortine D ED. Cristaux blancs (acétate d'éthyle). F 209-211°; $[\alpha]_D^{91} + 91^\circ$ (c = 1,2, CHCl_3). SM *m/e* 324 (M^+), 293, 207, 161, 137, 109. IR (KBr) 3420, 1735, 1250 cm^{-1} . RMN ^1H (250 MHz): δ ppm 0,92 (3 H, d, J = 7 Hz, CH_3 -14), 1,18 (3 H, s, CH_3 -15); 1,39 (1 H, d, J = 13 Hz, H-6_A); 1,45 (1 H, s, CH_3 -13); 1,65 (1 H, qd, $J_1 = 7$ Hz, $J_2 = 6$ Hz, H-4); 1,80 (1 H, d, J = 13 Hz, H-6_B); 2,12 (3 H, s, CH_3 COO); 2,62 (1 H, échangeable avec D_2O O-H); 3,16 (1 H, d, J = 4 Hz, H-1); 3,46 (1 H, dd, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 4$ Hz); 3,83 (2 H, s, CH_2 -12); 5,24 (1 H, dd, $J_1 = 6$ Hz, $J_2 = 5$ Hz). RMN ^{13}C : δ ppm (TMS) C-1, 50,2 (d); C-2, 57,6 (d); C-3, 71,3 (d); C-4, 41,7 (d); C-5, 38,4 (s); C-6, 35,6 (t); C-7, 68,4 ou 61,1 (s); C-8, 101,9 (s); C-9, 31,3 (t); C-10, 43,9 (s); C-11, 68,4 ou 61,1 (s); C-12, 69,7 (t); C-13, 11,3 (q); C-14, 9,7 (q); C-15, 15,5 (q); C-16, 171 (s); C-17, 20,8 (q). Analyse $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_6$ calc C, 62,95; H, 7,46. Trouvé C, 62,73, H, 7,44%.

Erémofortine E EE. Cristaux incolores (méthanol). F 240° (dec); $[\alpha]_D^{227} + 227^\circ$ (c = 5,4, CHCl_3). SM *m/e* 318 ($\text{M}^+ - 17$), 291, 276, 220, 178, 135, 121, 91; Masse haute résolution $\text{M}^+ - 17$, 318 1109 cal pour $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$, 318, 1103. UV CHCl_3 λ_{max} 250 nm (ϵ 15720). IR (KBr) 3480, 3160, 1735, 1710, 1680, 1665, 1620 cm^{-1} . RMN ^1H (60 MHz): δ ppm 1 (3 H, d, J = 7,5 Hz, CH_3 -14); 1,32 (3 H, s, CH_3 -15); 1,60 (3 H, s, CH_3 -13); 2,16 (3 H, s, CH_3 -COO); 3,6 (1 H, d, J = 3,5 Hz, H-1); 3,9 (1 H, m, H-2); 5,12 (1 H, t, J = 5 Hz, H-3); 5,6 (1 H, s, large, échangeable avec D_2O , N-H); 6,1 (1 H, s large, échangeable avec D_2O , N-H); 6,35 (1 H, s, H-9). RMN ^{13}C (15,08 MHz): δ ppm (TMS) C-1, 55,9 (d); C-2, 55,4 (d); C-3, 69,9 (d); C-4, 42,5 (d); C-5, 37,5 (s); C-6, 40,9 (t); C-7, 64,7 ou 63,2 (s); C-8 190,6 (s); C-9, 130,6 (d); C-10, 162,9 (s); C-11, 62,7 ou 63,2 (s); C-12, 172,6 (s); C-13, 16,6 (q); C-14, 10,2 (q); C-15, 22,2 (q); C-16, 170,7 (s); C-17, 20,7 (q).

PR imine (échantillon naturel). Cristaux blancs. F 214° F mélange identique avec échantillon de synthèse. $[\alpha]_D^{315} + 315^\circ$ (C = 4,8 CHCl_3); SM *m/e* 319 (M^+), 290, 276, 216, 188, 160; IR (KBr) 3150, 1735, 1625 cm^{-1} ; UV CHCl_3 , λ_{max} 248 nm (ϵ 12740). RMN ^1H (60 MHz): δ ppm 1 (3 H, d, J = 7 Hz, CH_3 -14); 1,35 (3 H, s, CH_3 -15); 1,62 (3 H, s, CH_3 -13); 2,16 (3 H, s, CH_3 COO); 3,7 (1 H, d, 3,5 Hz, H-1); 3,8 (1 H, m, H-2); 5,2 (1 H, t, J = 5 Hz, H-3); 5,4 (1 H, s, H-12); 5,4 (1 H large échangeable D_2O); 6,7 (1 H, s, H-9). RMN ^{13}C (15,08 MHz): δ ppm (TMS) C-1, 56,8 (d); C-2, 54,9 (d); C-3, 70,4 (d); C-4, 42,7 (d); C-5, 38,5 (s); C-6, 36,2 (t); C-7, 67,8 ou 72,1 (s); C-8, 157,8 (s); C-9, 124,7 (d); C-10, 157,8 (s); C-11, 67 ou 72,1 (s); C-12, 93,8 (d); C-13, 103 (q); C-14, 10,3 (q); C-15, 21,6 (q); C-16, 170,6 (s); C-17, 20,7 (q). Analyse $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}$ calc C, 63,93; H, 6,63; O, 25,05; N, 4,39. Trouvé C, 63,93; H, 6,70; O, 25,06; N, 4,36%.

Remerciements Nous remercions Mme A. Masset pour son excellente aide technique.

REFERENCES

- R. D. Wei, P. E. Still, E. B. Smalley, H. K. Schnoes et F. M. Strong, *App. Microbiology* **25**, 111 (1973).
- R. D. Wei, H. K. Schnoes, P. A. Hart et F. M. Strong, *Tetrahedron* **31**, 109 (1975).
- P. M. Scott, M. A. Merrien et J. Polonsky, *Experientia* **32**, 140 (1976); B. Arnoux, M. A. Merrien, C. Pascart, J. Polonsky et P. M. Scott, *J. Chem. Res. (S)*, 210 (1978).
- S. Ohmomo, T. Sato, T. Utagawa et M. Abe, *Agr. Biol. Chem.* **39**, 1333 (1975); S. Ohmomo, K. Oguma, T. Ohashi et M. Abe, *Ibid.* **42**, 2387 (1978).
- S. Moreau, A. Gaudemer, A. Lablache-Combier et J. Biguet, *Tetrahedron Letters* 833 (1976).
- S. Moreau, M. Cacan et A. Lablache-Combier, *J. Org. Chem.* **42**, 2632 (1977).
- Y. Moule, S. Moreau et J. F. Bousquet, *Chem. Biol. Interactions* **17**, 185 (1977).
- G. Germain, P. Main et M. M. Woolfson, *Acta Cryst.* **A27**, 368 (1971).
- B. Arnoux, C. Pascart et S. Moreau, *Ibid.* **B33**, 2930 (1977).
- F. C. Baker, C. J. W. Brooks et S. A. Hutchinson, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 293 (1975).
- G. Snatzke, *Tetrahedron* **21**, 421 (1975).
- P. Crabbe, Applications de la Dispersion Rotatoire Optique et du Dichroïsme circulaire Optique en Chimie Organique, Gauthier-Villars, Paris, p. 492 (1968).
- Acta Cryst.* A paraître.
- A. A. Newman, *Chemistry of Terpenes and Terpenoids*, p. 130. Academic Press, New York (1972).
- B. J. Hopkins et G. W. Perold, *J. Chem. Soc. Perkin I* 32 (1974).
- Y. Asakawa, J. C. Muller, G. Ourisson et G. Ducombs, *Bull. Soc. Chim.* 1465 (1976).
- N. H. Andersen, B. Shunk et C. R. Costin, *Experientia* **29**, 645 (1970); N. H. Andersen, *Phytochemistry* **9**, 145 (1970).
- C. Riche, C. Pascart-Billy, M. Devys, A. Gaudemer, M. Barbier et J. F. Bousquet, *Tetrahedron Letters* 2765 (1974).