

BIOSYNTHESE DE LA BOTRYODIPLODINE, MYCOTOXINE DE *PENICILLIUM ROQUEFORTI*: INCORPORATIONS D'ACETATE [1-¹³C], [2-¹³C], [1-2 ¹³C] ET D'ACIDE ORSELLINIQUE [2-¹³C-CARBOXYLE ¹³C], [3-4 ¹³C]

F. RENAULD et S. MOREAU*

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

et

A. LABLACHE-COMBIER

Laboratoire de Chimie Organique Physique, Associé à l'E.N.S.C.L., L.A. C.N.R.S. n° 351, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655-Villeneuve d'Ascq Cedex, France

(Received in France 15 May 1983)

Résumé—Les incorporations d'acétate [1-¹³C], [2-¹³C], [1-2 ¹³C] et d'acide orsellinique [2-¹³C, carboxyle-¹³C], [3-4 ¹³C] dans la botryodiplodine montrent que cette mycotoxine est biosynthétisée par la voie des polycétoacides. L'acide orsellinique est un précurseur de la botryodiplodine. Un chemin de biosynthèse, utilisant l'acide orsellinique comme précurseur, est proposé.

Abstract—Incorporations of [1-¹³C], [2-¹³C], [1-2 ¹³C] acetate and [2-¹³C, carboxyl-¹³C], [3-4 ¹³C] orsellinic acid into botryodiplodin indicate that this mycotoxin is biosynthesized by the polyketide pathway. Orsellinic acid is a precursor of botryodiplodin. A biosynthetic pathway, using orsellinic acid as precursor, is proposed.

L'intérêt accordé aux métabolites secondaires synthétisés par *Penicillium roqueforti*, espèce utilisée dans l'affinage du fromage de Roquefort, s'est particulièrement développé avec la découverte et la caractérisation d'une toxine sesquiterpénique: la PR Toxine.¹ Du milieu de culture de ce champignon il a été ainsi possible d'isoler d'autres métabolites sesquiterpéniques.^{2,3} Des alcaloïdes ont également été isolés du mycélium de cette espèce.^{4,5} Dernièrement, au cours de recherches systématiques sur la toxicité de diverses souches, nous avons isolé et caractérisé une nouvelle toxine de *Penicillium roqueforti*, la botryodiplodine (I).⁶

Cette mycotoxine a été isolée pour la première fois de *Botryodiplodia theobromae*⁷ dans le cadre de recherche d'antibiotiques d'origine fongique. Ce composé s'avère en réalité être mutagène dans le test de Ames⁸ et présenter la particularité de créer des pontages entre ADN et protéines.^{9,10}

La voie de biosynthèse de cette molécule est inconnue. Son classement repose uniquement sur sa structure chimique de type furane.¹¹ Nous étudions ici les voies de biosynthèse de la botryodiplodine par l'incorporation de divers précurseurs enrichis au carbone-13 (acétate de sodium, acide orsellinique) à l'aide de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les spectres RMN ¹³C de la botryodiplodine naturelle et enrichie sont effectués sur le dérivé acétylé de la botryodiplodine, qui permet d'obtenir un dérivé cristallisé avec un bon rendement et une attribution sans ambiguïté des résonances observées.³

Les résultats des incorporations d'acétate de sodium [1-¹³C], [2-¹³C], [1-2 ¹³C] au niveau de la botryodiplodine sont reportés Tableau 1 et figures 1 et 2.11 apparaît que la botryodiplodine est un métabo-

Tableau 1. Déplacements chimiques des carbones de l'acétyl botryodiplodine observés dans CDCl₃ (δ, référence interne Me₄Si), constantes de couplages (Hz) et enrichissements après incorporations d'acétate de sodium (1-¹³C) (■), (2-¹³C) (●), (1-2 ¹³C)

Carbone	δppm	J(¹³ C- ¹³ C)	enrichissement
1	104.2		●
2	41.7	34.2	■
3	52.8	35.0	●
4	67.7	35.0	■
5	12.2	34.2	●
6	205.4	40.8	■
7	30.3	40.8	●
8	170.3		
9	21.5		

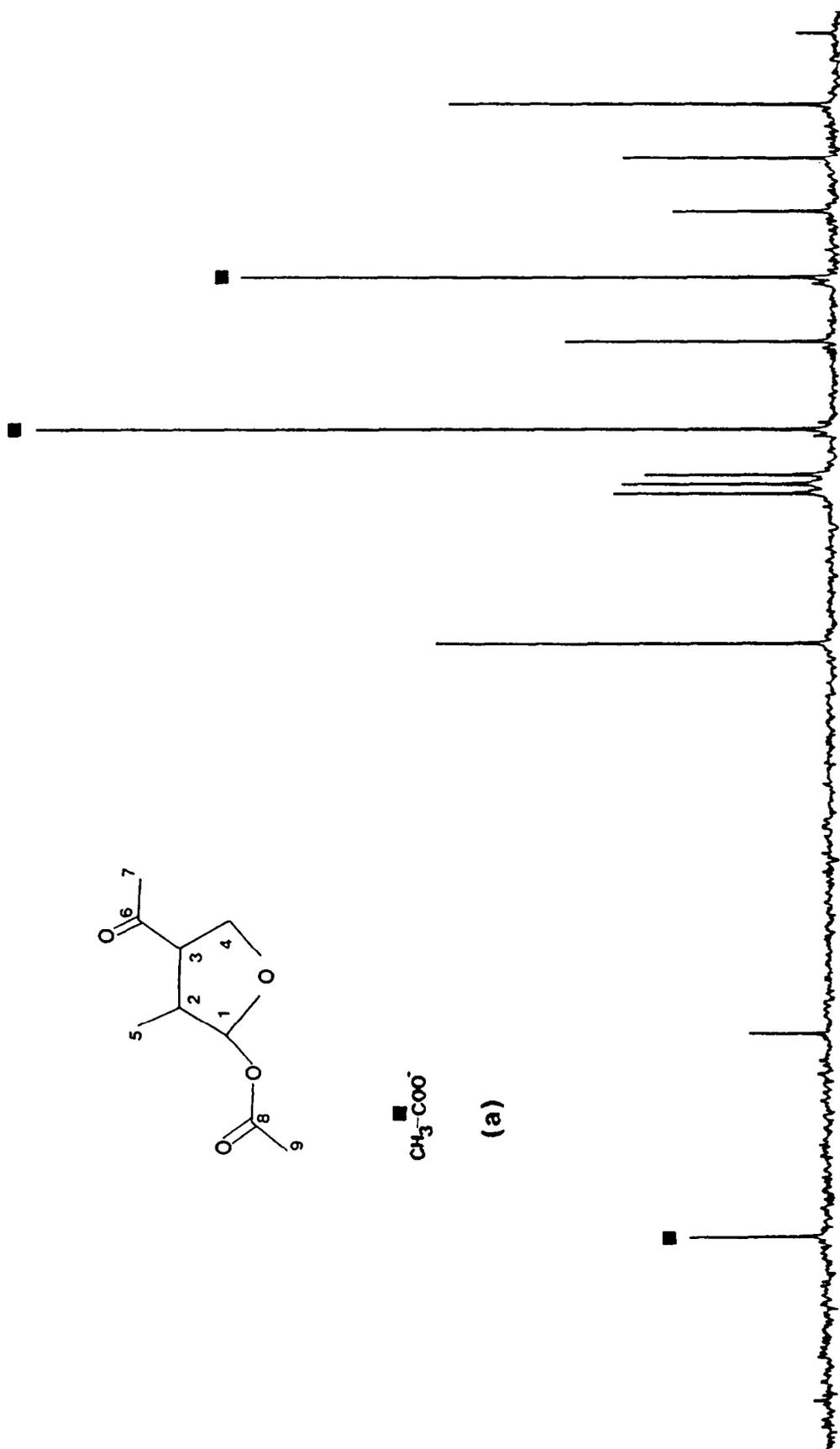


Fig. 1(a).

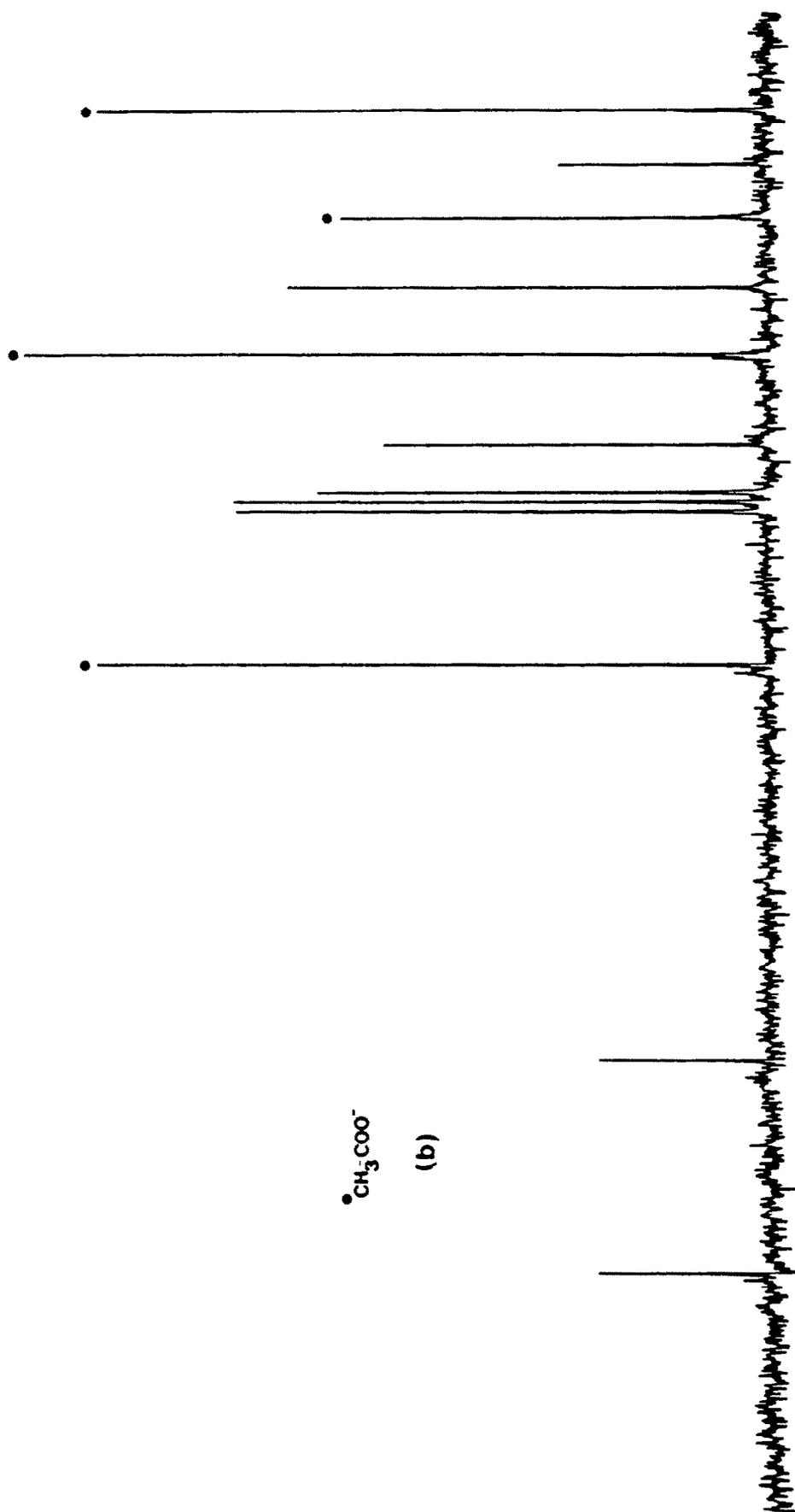


Fig. 1(b).

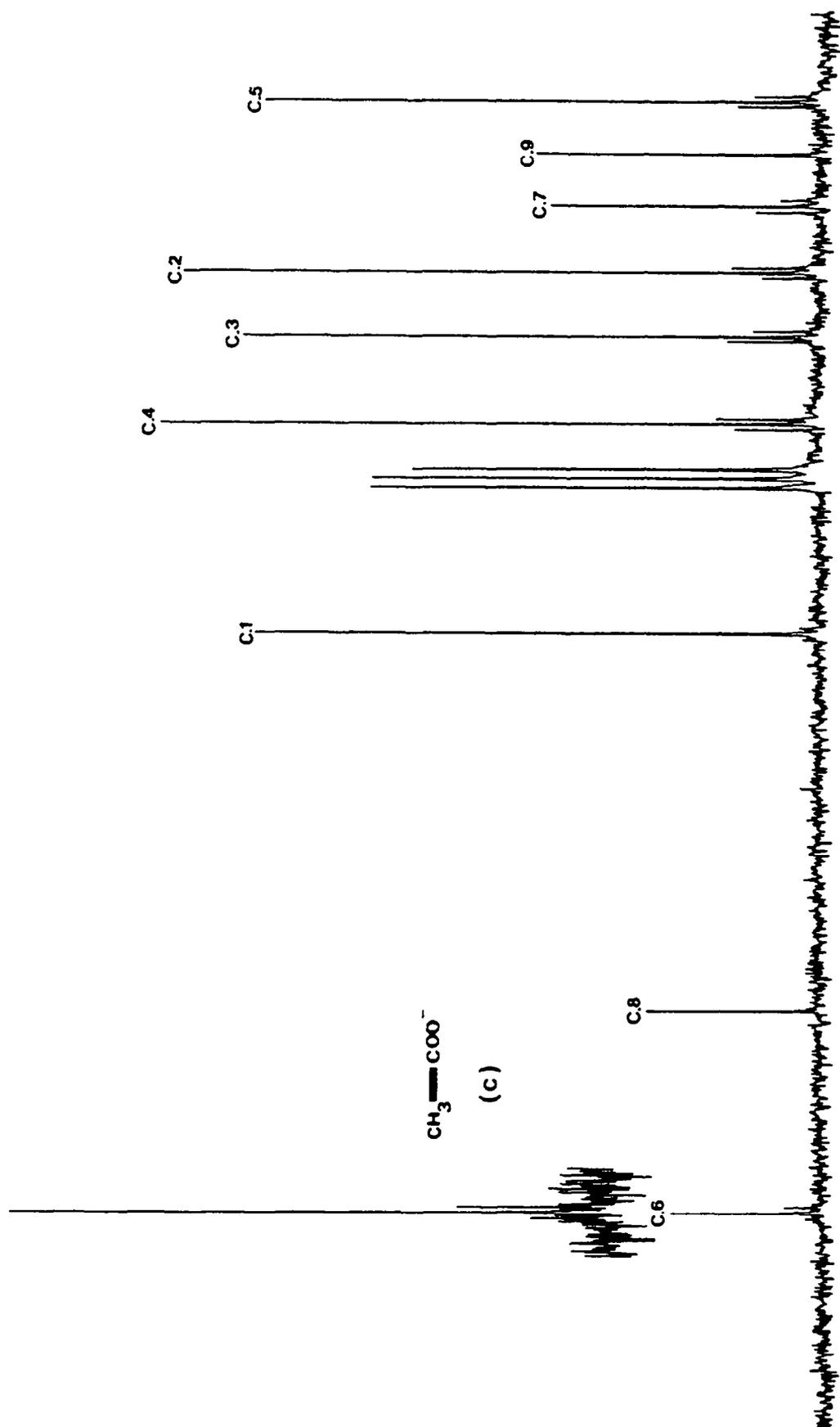


Fig. 1(c).

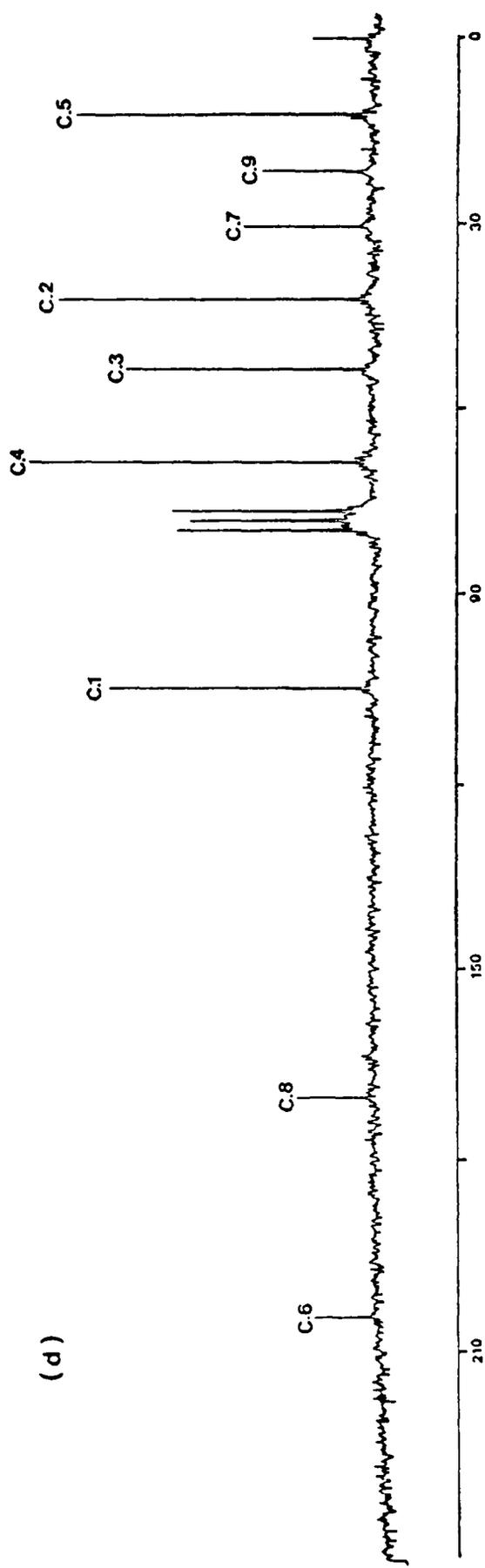


Fig. 1. Déplacements chimiques des carbones de l'acétyl botryodiplodine résultant des incorporations d'acétate de sodium ($1-^{13}\text{C}$) (a), ($2-^{13}\text{C}$) (b), ($1-2-^{13}\text{C}$) (c), et à abondance naturelle (d) observés dans CDCl_3 .

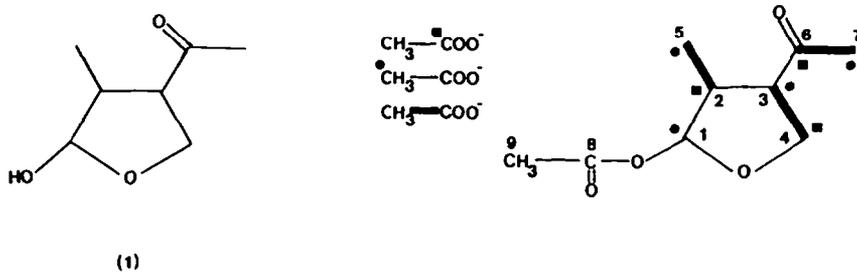


Fig. 2. Distribution de l'enrichissement et de l'enchaînement des unités acétate observés dans l'acétyl botryodiplodine.

lite secondaire biosynthétisé par la voie des acétates. La détermination de l'arrangement des unités acétates, basée sur la mesure des constantes de couplage montre la présence de trois unités acétates. Le C-1 de la botryodiplodine, provenant d'un méthyl d'une unité acétate supplémentaire, ne présente pas de couplage. Le carboxyle correspondant a donc été éliminé lors du processus biosynthétique. La botryodiplodine dérive probablement d'un tétracétoacide.

L'acide orsellinique (2), métabolite synthétisé par de nombreux champignons et lichens est biosynthétisé à partir d'un tétracétoacide.¹² Il a été impliqué dans la biosynthèse de nombreux métabolites tels que, la fumigatine, l'acide pénicillique, l'acide stipitatique.¹³ D'autre part, il est intéressant de remarquer qu'une souche de *Penicillium roqueforti* s'est avérée capable d'élaborer conjointement la patuline et l'acide pénicillique.¹⁴ En considérant ces divers aspects, nous avons cherché à déterminer si l'acide orsellinique pouvait être également un précurseur de la botryodiplodine.

Dans un premier temps, nous avons vérifié cette hypothèse avec un acide orsellinique marqué au carbone 14. L'incorporation d'acide orsellinique [2-¹⁴C], possédant une activité spécifique de 5 μ Ci/m mole, a permis d'obtenir l'acétyl botryodiplodine ayant une activité spécifique de 0.23 μ Ci/m mole. Le pourcentage d'incorporation spécifique obtenu (activité spécifique du produit final/activité spécifique du précurseur) de 4.6%, est une première confirmation de l'hypothèse envisagée.

Sur cette base, il est possible de proposer une voie de biosynthèse de la botryodiplodine (Schéma 1) utilisant l'acide orsellinique comme précurseur, et faisant intervenir des réactions fréquemment ren-

contrées dans les schémas biosynthétiques (réduction, coupure oxydative, époxidation, décarboxylation).

Nous avons cherché à vérifier ce schéma hypothétique par incorporation de divers acides orselliniques enrichis en ¹³C.

La synthèse des divers acides orselliniques marqués est décrite dans la partie expérimentale; l'attribution des raies ¹³C du spectre à abondance naturelle de l'acide orsellinique est basée sur les données de la littérature^{15,16} et des mesures en off-resonances (Tableau 2).

Le résultat de l'incorporation d'acide orsellinique [2-¹³C], carboxyle ¹³C] (3) au niveau de la botryodiplodine est représenté Fig. 3(b). Seuls les carbones C-4 et C-7 sont enrichis, aucune redistribution d'acétate, pouvant résulter d'une dégradation biologique de l'acide orsellinique, n'est observée.

Afin de montrer clairement l'ouverture de l'acide orsellinique et la position du carbone éliminé lors de la biosynthèse, nous avons synthétisé et incorporé un acide orsellinique [3-4 ¹³C] (4).

La distribution du marquage au niveau de la botryodiplodine est représentée dans Figure 3(c).

Il apparaît que seul le C-7 de la botryodiplodine est enrichi. Aucun couplage carbone-carbone n'est visible. L'un des carbones enrichis de l'acide orsellinique [3-4 ¹³C] a été éliminé lors de la biosynthèse de la botryodiplodine. Ce carbone correspond au C-4 de l'acide orsellinique; en effet, l'enchaînement des unités acétates dans l'acide orsellinique¹² montre que le carbone 4 provient d'une fonction carboxylique de l'acétate. D'autre part, les études des incorporations d'acétate [1-¹³C], [2-¹³C], [1-2 ¹³C] dans le squelette de la botryodiplodine, montre qu'il y a coupure d'une unité acétate et perte d'un carbone issu du carboxyle. Toutes ces observations expérimentales sont en ac-

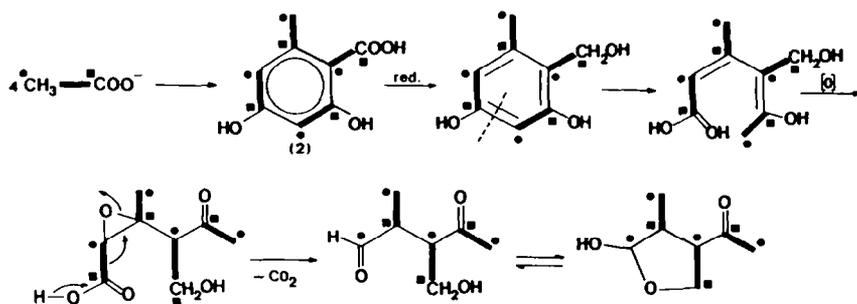


Schéma 1.

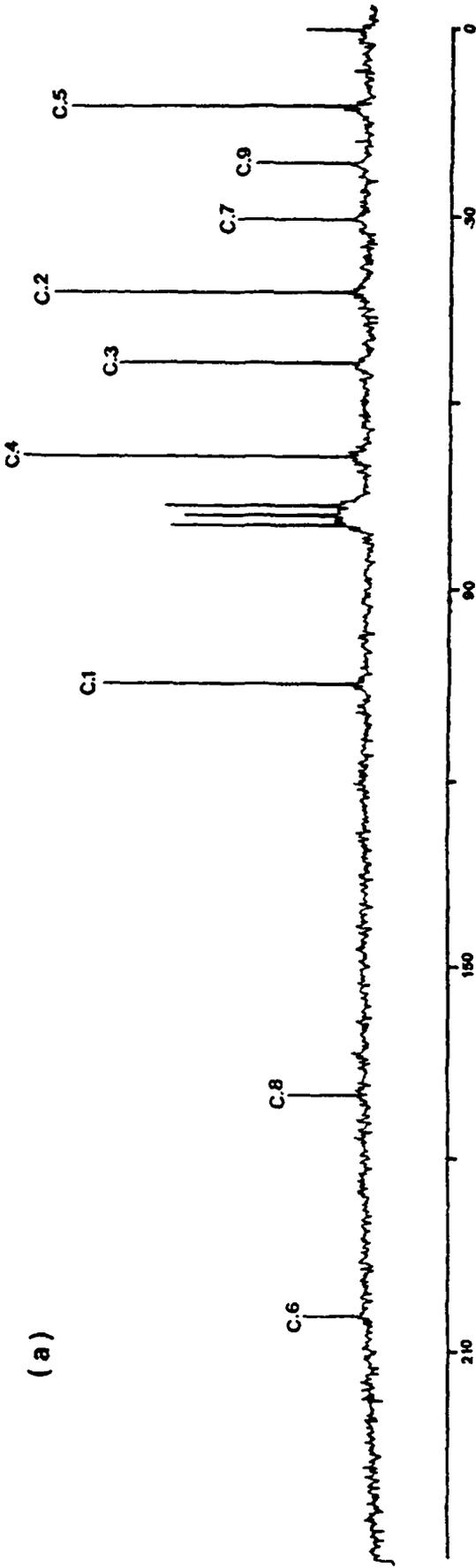
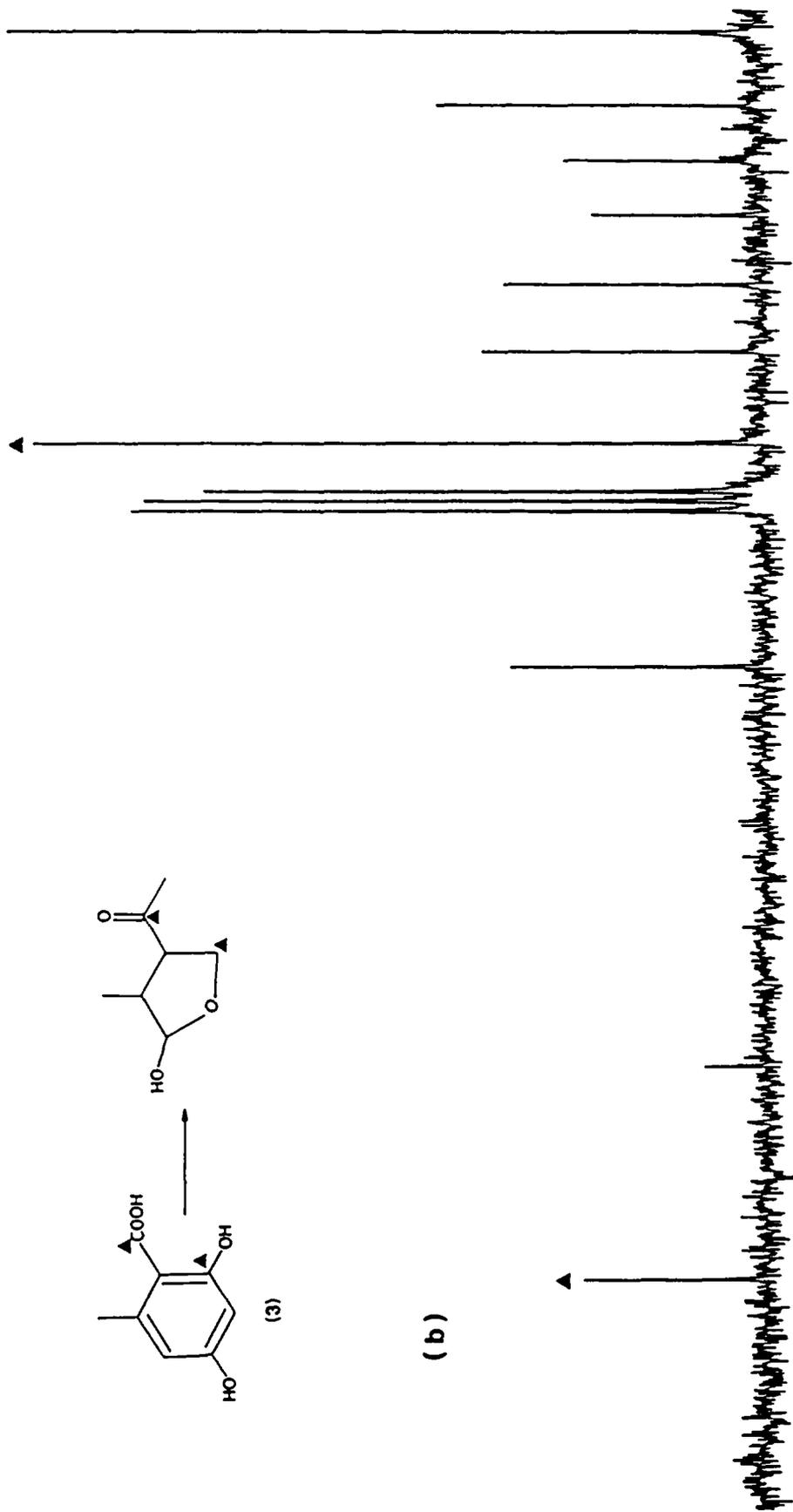


Fig. 3(a).



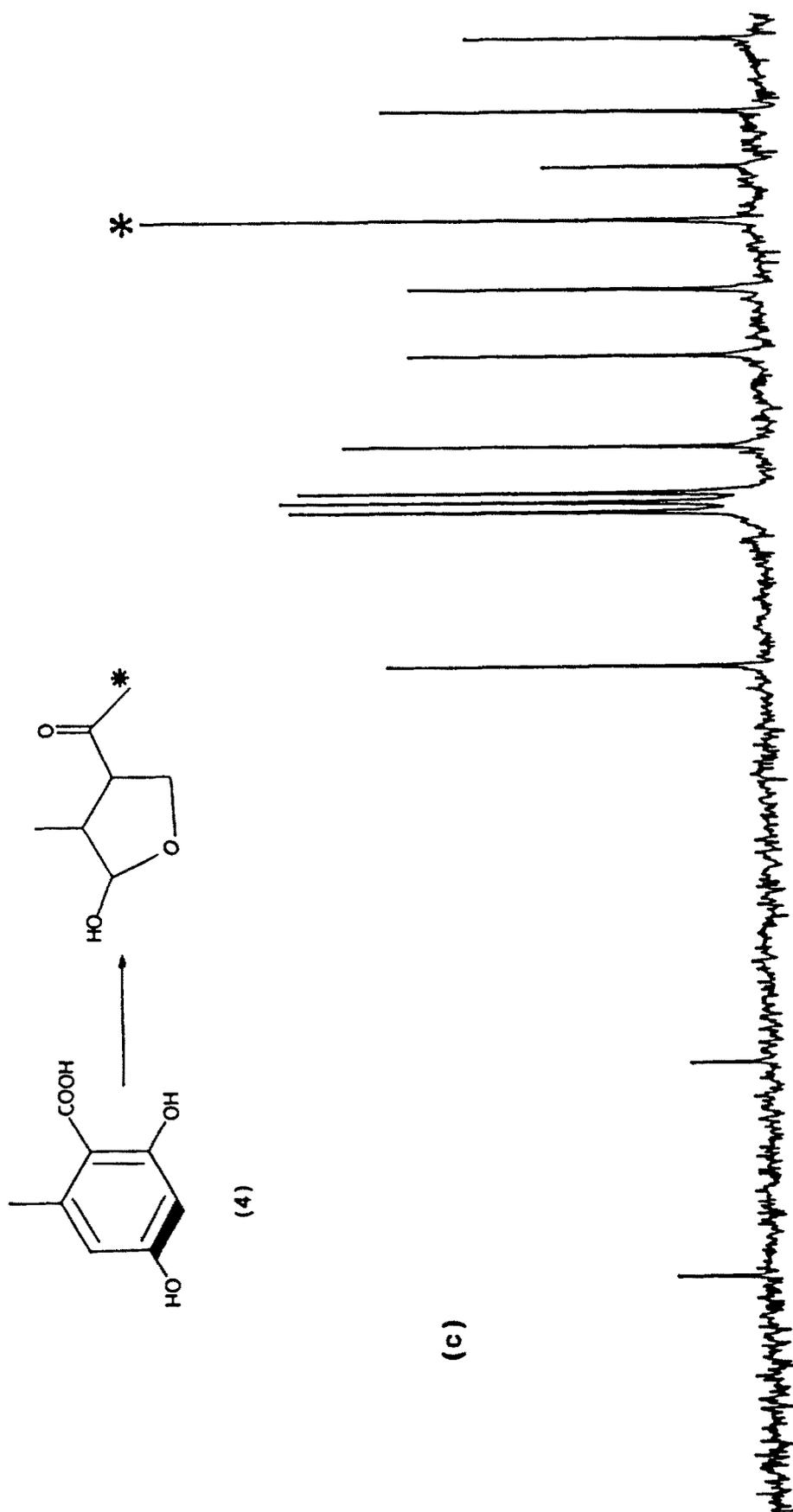


Fig. 3. Déplacements chimiques des carbones de l'acétyl botryodiplodine à abondance naturelle (a), et résultant des incorporations d'acide orsellinique ($2\text{-}^{13}\text{C}$, carboxyle ^{13}C), ($3\text{-}4\text{-}^{13}\text{C}$) (c), observés dans CD_3Cl .

Tableau 2. Déplacements chimiques des carbones de l'acide orsellinique à abondance naturelle et enrichi au carbone 13, observés dans CD₃CN.

Carbone	1	2	3	4	5	6	7	8
1	105.2							
2	166.2	166.2						
3	101.4		101.4	101.4	101.4	101.4		
4	163.2			163.2	163.2	163.2		
5	112.6				112.6			
6	145.1					145.1		
7	24.7						24.7	
8	176.4	176.4						

cord avec la répartition du marquage résultant de l'hypothèse choisie (Schéma 1).

L'étape clé de ce schéma est une ouverture du cycle aromatique entre C-3 et C-4. Une telle coupure oxydative a déjà été proposée dans une position analogue pour la biosynthèse de la sclérine.²² Dans le cas de la biosynthèse de l'acide pénicillique, la coupure se fait en C-4-C-5 par l'intervention d'une réaction type Baeyer-Villiger.¹³ L'étape suivante, qui est une décarboxylation oxydative en milieu acide, fait appel à un mécanisme classique.¹³

La botryodiplodine s'ajoute donc à la liste des métabolites ayant comme intermédiaire biosynthétique l'acide orsellinique.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres RMN ¹H (60 MHz) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker WP 60. Les spectres RMN ¹³C (19.1 MHz) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker WP 80. Le TMS est utilisé comme référence interne. Les spectres de masse sont déterminés sur un spectromètre AEI MS 12. Les points de fusion ont été pris sur un banc Kofler. Les comptages ¹⁴C ont été réalisés sur un compteur à scintillation β Intertechnique.

Organismes

La souche B-26 utilisée a été isolée d'un sillot de maïs par J. Pelhate (Brest, France).

Milieu de culture

Le milieu de culture est constitué de 2% d'extrait de levure (Difco) et 15% de saccharose dans de l'eau déminéralisée. Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave.

Culture

Les cultures sont effectuées dans des fioles de Roux de 800 ml avec 150 ml de milieu. Chaque fiole est inoculée avec environ 10⁶-10⁸ spores de *Penicillium roqueforti*. Les fioles de Roux sont incubées en culture stationnaire pendant 12 jours à 25° à l'obscurité.

Extraction et purification de la botryodiplodine

Les cultures sont filtrées et extraites au chloroforme. La phase chloroformique est évaporée à sec et on obtient une huile brune. Une première chromatographie réalisée sur une colonne de silice est éluee par un gradient

chloroforme-méthanol (V:V; 0:100, 2:98, 5:95, 10:90). La fraction 2:98 est évaporée et laisse une huile jaune contenant la botryodiplodine. La botryodiplodine est purifiée par HPLC sur une colonne semi-préparative (50 cm long, 1 cm diam). Lichroprep 5-20 μm (Merck) et éluee par un mélange d'acétate d'éthyl/n hexane (70/30 V/V). La botryodiplodine récupérée est cristallisée dans l'éther éthylique, mp 50-52°.

Acétyl botryodiplodine

L'acétylation pyridinique de la botryodiplodine conduit à un composé, que l'on cristallise dans l'éther éthylique, ayant les mêmes caractéristiques chimiques citées dans la littérature.⁶

Incorporations

Incorporation d'acétate de sodium [1-¹³C] 90%. On utilise 10 fioles de culture. L'acétate de sodium [1-¹³C] (500 mg) est additionné stérilement en solution aqueuse aux 6, 7, 8, 9 et 10 jours de culture, à raison de 10 mg par fiole et par culture. La culture est extraite et la botryodiplodine purifiée comme précédemment.

Incorporation d'acétate de sodium [2-¹³C] 90%, acétate de sodium [1-2-¹³C] 90%. Les incorporations d'acétate de sodium [2-¹³C] et [1-2-¹³C] ont été effectuées comme précédemment en utilisant 500 mg d'acétate de sodium [2-¹³C] 90% et 250 mg d'acétate de sodium [1-2-¹³C].

Incorporation d'acide [2-¹⁴C] orsellinique (5 μCi/nmole). Un utilise 2 fioles de culture. L'acide 2-¹⁴C orsellinique (10⁶ cpm) est additionné stérilement en solution sodique aux 9 et 10 jours de culture, à raison de 2.5. 10⁵ cpm par jours et par fiole. La culture est extraite et la botryodiplodine purifiée.

Incorporation d'acide [2-¹³C, carboxyle ¹³C] orsellinique (3). Un utilise 5 fioles de culture, 100 mg d'acide [2-¹³C, carboxyle ¹³C] (90%) sont additionnés stérilement de la même manière que précédemment. La botryodiplodine est extraite de purifiée.

Incorporation d'acide [3-4-¹³C] orsellinique (4). L'incorporation d'acide [3-4-¹³C] orsellinique (90%) a été effectuée comme précédemment en utilisant 100 mg d'acide [3-4-¹³C] orsellinique.

Synthèse des précurseurs ¹⁴C et ¹³C

Acide orsellinique [2-¹⁴C]. L'acide orsellinique [2-¹⁴C] est synthétisé à partir d'acétoacétate d'éthyl [3-¹⁴C] (Amersham, Angleterre) comme décrit dans la littérature,¹⁷ m.p. 173-175° (lit. 172-174°), spectre de masse, m/e 168 (M⁺, 55.1), 150 (100), 124 (55.6), 122 (59.6), 94 (27.9), 69 (17.8); RMN ¹H (DMSO D6) δ 2.10 (3H, s), 5.55 (2H, s), 9.10 (2H,

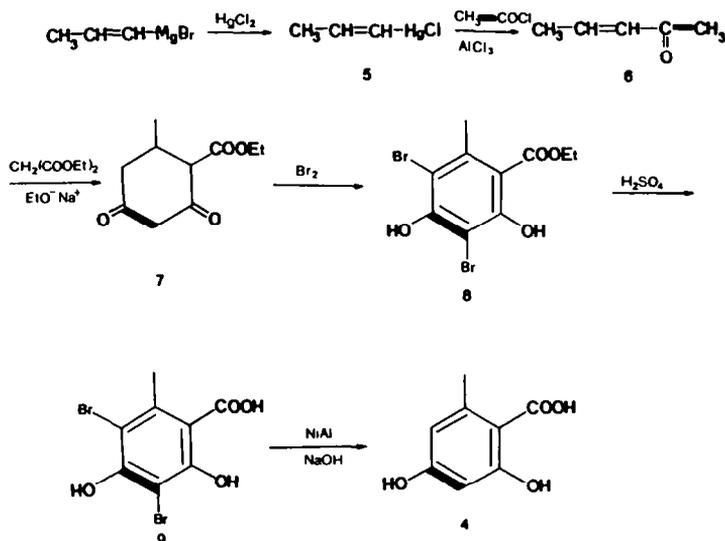


Schéma 2.

s); RMN ^{13}C (CD_3CN) δ 24.7 (q), 101.4 (d), 105.2 (s), 112.6 (d), 145.1 (d), 163.2 (s), 166.2 (s), 176.4 (s). Activité spécifique: $5 \mu\text{Ci}/\text{mmole}$.

Acide orsellinique [2- ^{13}C , carboxyle ^{13}C] (3). L'acide orsellinique [2- ^{13}C , carboxyle ^{13}C] est synthétisé à partir d'acétoacétate d'éthyl [1-3 ^{13}C] (90%) comme décrit précédemment. L'acétoacétate d'éthyl [1-3 ^{13}C] est synthétisé par condensation d'acétate d'éthyl [1- ^{13}C] (90%) dans une suspension d'hydrure de sodium dans le toluène.¹⁸ Spectre de masse, m/e 170 (M^+ , 48.9), 152 (100), 123 (75.1), 94 (31), 70 (29.1). RMN ^{13}C (CD_3CN) δ 166.2, 176.4.

Acide orsellinique [3-4 ^{13}C] (4). La synthèse de l'acide orsellinique [3-4 ^{13}C] a été réalisée à partir de chlorure d'acétyle [1-2 ^{13}C] suivant le schéma réactionnel décrit schéma 2. Chlorure 1 propène mercure (5): 4.35 g (30 mmoles) de bromo 1 propène magnésium, synthétisé comme décrit,¹⁹ sont dissous dans 250 ml de THF anhydre. La solution est refroidie à 0° et 8.1 g (30 mmoles) de chlorure de mercure sont ajoutés en 5 min.²⁰ Le mélange réactionnel est laissé 2 h à 0° sous vive agitation. En fin de réaction, le THF est évaporé et une extraction à l'éther éthylique permet de récupérer 6.9 g de cristaux blancs (5) que l'on cristallise dans le méthanol. $m.p.$: $78-84^\circ$. RMN ^1H (CDCl_3) 2.0 (3H,m), 5.90 (2H, m).

3-Pentène 2 one [1-2 ^{13}C]. 2.61 g (20 mmoles) de chlorure d'aluminium et 1.5 g (20 mmoles) de chlorure d'acétyle [1-2 ^{13}C] (90%) sont dissous dans 50 ml de dichlorométhane. La solution est refroidie à -10°C et on ajoute en 5 min, 5.5 g (20 mmoles) de (5) dissous dans 50 ml de dichlorométhane.²¹ Le mélange réactionnel est laissé 5 min. sous vive agitation, jeté sur l'eau, extrait au dichlorométhane et séché sur magnésium sulfate. Après évaporation du solvant, on récupère 1.5 g de (6) pur.

Dihydro orsellinate d'éthyl [3-4 ^{13}C] (7). 410 mg (18 mmoles) de sodium sont dissous dans 100 ml d'éthanol absolu. A cette solution sont ajoutés 2.9 g (18 mmoles) de diéthylmalonate et 1.5 g (18 mmoles) de (6). L'ensemble est laissé 2 h à 20° , neutralisé par HCl dilué, extrait à l'éther éthylique et séché sur magnésium sulfate. Après évaporation du solvant, on obtient 3.3 g d'une huile que l'on cristallise dans l'éthanol. On récupère 3.1 g de (7). $m.p.$: $70-72^\circ$ (lit. $71-75^\circ$).

Dibromo orsellinate d'éthyl [3-4 ^{13}C] (8). 3.1 g (17 mmoles) de (7) sont dissous dans 10 ml d'acide acétique glacial. 2.7 g (17 mmoles) de brome dissous dans 10 ml d'acide acétique sont additionnés en 30 min. L'ensemble est laissé 12 h à 20° . Le précipité de (8) est filtré et l'on récupère 4.8 g de cristaux blancs. $m.p.$ $143-145^\circ$ (lit $143-145^\circ$).

Acide dibromo orsellinique [3-4 ^{13}C] (9). 4.8 g de (8) sont dissous dans 10 ml d'acide sulfurique 98% et laissés 30 min à 20° . L'ensemble est jeté sur l'eau et (9) est filtré. On récupère 3.8 g de cristaux blancs. $m.p.$ $210-212^\circ$ (lit $212-213^\circ$).

Acide orsellinique [3-4 ^{13}C] (4). 3.8 g de (9) sont dissous dans 100 ml de soude 2N à 0° . 3g d'un alliage nickel-aluminium sont ajoutés en 20 min et l'ensemble est laissé 2 h à 0° . Le mélange réactionnel est filtré, acidifié et extrait à l'éther éthylique. Après séchage sur magnésium sulfate et évaporation du solvant, on obtient 1.6g de cristaux que l'on recristallise dans un mélange eau-acétone. On récupère 1.2g de (3). $m.p.$ $173-175^\circ$, spectre de masse, m/e 170 (M^+ , 47.3), 152 (96.4), 124 (100), 96 (70), 79 (10.3), 71(43.0). RMN ^{13}C (CD_3CN) δ : 101.4 (d, $J = 67.1$ Hz), 163.2 (d, $J = 67.1$ Hz).

Remerciement—Nous remercions B. Mouchel pour les mesures RMN ^{13}C .

REFERENCES

- R. D. Wei, H. K. Schnoes, P. A. Hart et F. M. Strong, *Tetrahedron*, **31**, 109 (1975).
- S. Moreau, A. Gaudemer et A. Lablache-Combiere, *Tetrahedron Letters*, 833 (1976).
- S. Moreau, M. Cacan et A. Lablache-Combiere, *J. Org. Chem.* **42**, 2632 (1977).
- S. Ohmumo, K. Oguma, T. Ohashi et M. Abe, *Agric. Biol. Chem.* **42**, 2387 (1978).
- J. Polonsky, M. A. Merrien, T. Prange, C. Pascard et S. Moreau, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 601 (1980).
- S. Moreau, A. Lablache-Combiere, J. Biguet, C. Foulon et M. Delfosse, *J. Org. Chem.* **47**, 2358 (1982).
- G. P. Arsenault, J. R. Althaus et P. V. Direkar, *Chem. Commun.* 1414 (1969).
- Y. Moulé, F. Decloitre et G. Hamon, *Envir. Mut.* **3**, 287 (1981).
- Y. Moulé, F. Renaud, N. Darracq et C. Douce, *Carcinogenesis*, **3**, 211 (1982).
- C. Douce, S. Moreau, F. Decloitre et Y. Moulé, *Ibid.* **3**, 587 (1982).
- T. K. Devon et A. I. Scott, *Handbook of Naturally Occurring Compounds*, Vol. 1, p. 403. Academic Press, New York, (1975).
- K. Mosbach, *Acta Chem. Scand.* **14**, 457 (1960).
- P. Manitto, *Biosynthesis of Natural Products*, p. 190. Ellis Horwood (1980).
- F. J. Olivigni et L. B. Bullerman, *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 435 (1978).

- ¹⁵M. Yamazaki, T. Usami et T. Takeuchi, *Nippon Kagaku, Kaishi* **11**, 2135 (1973).
- ¹⁶J. Guilleme, J. Pons, E. Diez et C. Pascual, *Anal. Quimica* **93** (1977).
- ¹⁷J. Santesson, *Acta Chem. Scand.* **24**, 3373 (1970).
- ¹⁸A. A. Hinckky, *Sodium Hydride Dispersions*. Metal Hydrides, Inc. (July 1964).
- ¹⁹H. Wormant, *Bull. Soc. Chim. France* **728** (1957).
- ²⁰H. Staub, K. P. Zeller et H. Leditschke, dans *Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie*, 4th Edn, Vol. 13, p. 62.
- ²¹R. C. Larock et J. C. Bernhardt, *Tetrahedron Letters* **3097** (1976).
- ²²M. J. Garson et J. Staunton, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **928**.