

50376
1980
56

50376
1980
56

N° d'ordre : 476

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

Serge MOREAU

MYCOTOXINES DE PENICILLIUM ROQUEFORTI



Soutenu le 13 mai 1980 devant la Commission d'Examen

M.	D. BARTON	Président
M.	A. LABLACHE-COMBIER	Rapporteur
M.	A. GAUDEMER	Rapporteur
M.	J. LHOMME	Rapporteur
M.	J. BIGUET	Rapporteur
Mlle	Y. MOULÉ	Examinatrice

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale

M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEBRUN André	Electronique
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LHOMME Jean	Chimie
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	PAQUET Jacques	Géologie Générale
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	CHAPOTON Alain	Electronique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme	CORSIN Paule	Sciences de la Terre
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	CRAMPON Norbert	Sciences de la Terre
M.	CROSNIER Yves	Electronique
Mme	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale

M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Mathématiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEMAIRE Jean	Physique
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquée
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RICHARD Alain	Biologie

M.	RIETSCH François	Chimie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M.	SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme	SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M.	SCHAMPS Joël	Physique
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique
M.	SOMME Jean	Géographie
Mme	SPIK Geneviève	Biochimie
M.	STERBOUL François	Informatique
M.	TAILLIEZ Roger	Biologie
M.	THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M.	VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M.	VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M.	WALLART Francis	Chimie
M.	WATERLOT Michel	Géologie Générale
M.	WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
Mme	ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

*Ce travail a été effectué à l'Unité I.N.S.E.R.M. U-42
de Biochimie et Biologie Parasitaire et Fongique.*

Je remercie Monsieur le Professeur BARTON, Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette, de l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le Jury de cette thèse. Je le prie d'accepter ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il a porté à la synthèse chimique de modèles de la PR Toxine.

Je remercie Monsieur LABLACHE-COMBIER, Professeur à l'Université de Lille I et Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, de m'avoir témoigné un grand intérêt tout au long de ce travail qui ne correspond pas strictement à son activité scientifique.

Je remercie Mademoiselle MOULÉ, Directeur de Recherche au C.N.R.S. à l'Institut de Recherche Scientifique sur le Cancer de Villejuif, d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour l'aide qu'elle m'a apportée dans la conception de cette thèse.

Je remercie Monsieur GAUDEMER, Professeur de Chimie à l'Université d'Orsay, d'avoir accepté d'examiner ce travail et de m'avoir consacré beaucoup de son temps en de précieuses discussions.

Je remercie Monsieur LHOMME, Professeur de Chimie Organique à l'Université de Lille I, d'avoir accepté de participer au Jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur BIGUET, Professeur de Parasitologie à l'Université de Lille II, Directeur de l'Unité I.N.S.E.R.M. U-42, pour la confiance qu'il m'a témoignée. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour le climat humain très enrichissant qu'il entretient dans son laboratoire.

Je tiens à remercier tous les membres de l'"U-42"
pour leur aide, leurs conseils et leur amitié.

Ma reconnaissance va en particulier à
Madame Annick MASSET pour son aide très précieuse tout au
long de ce travail.

Je remercie Madame Noëlla STRATMAINS qui a réalisé
avec soin et patience la dactylographie de cette thèse, ainsi
que Madame Lucienne SAINLEGER qui s'est chargée de son
impression.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
<u>PENICILLIUM ROQUEFORTI</u>	11
STRUCTURES DES SESQUITERPENES DE <u>P. ROQUEFORTI</u>	15
- STRUCTURE ET STEREOCHIMIE DE LA PR TOXINE.....	19
- STRUCTURE DE L'EREMOFORTINE A.....	20
- STRUCTURE DE L'EREMOFORTINE B.....	25
- STRUCTURE DE L'EREMOFORTINE C.....	26
- STRUCTURE DE L'EREMOFORTINE D.....	31
- STRUCTURE DE L'EREMOFORTINE E.....	34
- STRUCTURE DE LA PR IMINE.....	37
- ETUDE STEREOCHIMIQUE DE LA SERIE.....	38
- PUBLICATIONS.....	45
BIOSYNTHESE DES SESQUITERPENES DE <u>P. ROQUEFORTI</u>	73
- METABOLISME SECONDAIRE.....	75
- BIOSYNTHESE DES TERPENES.....	79
I - ASPECTS GENERAUX.....	79
II - BIOSYNTHESE DES SESQUITERPENES DE TYPE EREMOPHILANE.....	83
- BIOSYNTHESE DES SESQUITERPENES DE <u>P. ROQUEFORTI</u>	91
I - BIOSYNTHESE DU SQUELETTE CARBONE - ETUDE PAR INCORPORATION DE CARBONE 13.....	
1° - Application de la R.M.N. du ¹³ C à l'élucidation des voies de biosynthèse...	91
2° - Biosynthèse de la PR toxine - Etude de l'incorporation de CH ₃ - ¹³ COONa.....	94
3° - Etude de l'incorporation de l'acétate de sodium ¹³ C 1-2.....	97

.../...

.../...

II - ETUDE CINETIQUE DE LA PRODUCTION DES METABOLITES.....	109
1° - Schéma hypothétique de la séquence.....	109
2° - Dosage des métabolites.....	111
a) <i>Stabilité des temps de rétention</i>	112
b) <i>Reproductibilité des hauteurs de pics</i>	112
c) <i>Sensibilité</i>	116
d) <i>Relation entre hauteur de pic et quantités</i>	116
3° - Cinétique de <u>EA</u> , <u>PRT</u> , <u>EB</u> , <u>EC</u>	116
III - ENZYMES DE <u>P. ROQUEFORTI</u>	120
1° - Hydroxylation du méthyle C-12.....	120
2° - Réaction d'oxydation de l'hydroxyle en 12	122
IV - BIOSYNTHESE DE <u>EE</u> ET PR IMINE.....	124
- CONCLUSION.....	127
ACTIVITES BIOLOGIQUES DE <u>PRT</u>	129
- TOXICITE.....	131
- ALTERATIONS METABOLIQUES INDUITES PAR <u>PRT</u>	133
I - ACTION SUR LA REPLICATION.....	133
II - ACTION SUR LA TRANSCRIPTION.....	134
III - ACTION SUR LA TRADUCTION.....	134
- DETERMINATION DES GROUPES ACTIFS DE <u>PRT</u>	135
- PUBLICATION.....	138
- ACTION DE <u>PRT</u> AU NIVEAU DU DNA.....	153
I - LIAISON DE <u>PRT</u> AUX MACROMOLECULES.....	153
II - ETUDE DE LA NATURE DE LA LIAISON.....	154
- ROLE DES AUTRES GROUPEMENTS FONCTIONNELS DE <u>PRT</u>	157
- PUBLICATION.....	160
- CONCLUSION DES EFFETS BIOLOGIQUES.....	171
- METABOLISATION HEPATIQUE.....	175
I - GENERALITES SUR LE MECANISME DE DETOXICATION..	175
II - METABOLISATION PAR DES ENZYMES DE L'HEPATOCYTE DE RAT.....	178
1° - Métabolisation de <u>PRT</u>	180

.../...

.../...

2° - Métabolisation de EA.....181

- PUBLICATION.....185

- SYNTHESES CHIMIQUES.....193

LA BOTRYODIPLODINE.....197

CONCLUSION.....209

PARTIE EXPERIMENTALE.....213

BIBLIOGRAPHIE.....240

INTRODUCTION

--0000000--

L'intérêt accordé aux moisissures contaminant nos denrées alimentaires, en ce qui concerne leur toxino-génèse est très récent. Les contaminations par les moisissures, généralement appréciées à l'oeil, étaient considérées comme de banales souillures. Si l'homme hésitait à consommer des produits altérés du fait de leur aspect, de leur odeur, ou de leurs saveurs différentes des produits sains, il n'hésitait que rarement à les donner en nourriture aux animaux. L'ergot de seigle responsable du "mal des ardents" était pourtant bien connu. Que certaines moisissures soient productrices d'antibiotiques à l'usage largement répandu incitait à croire à l'innocuité des produits moisissés. Il faudra que se produise en Angleterre, en 1950, une épidémie des élevages de dindes ("Turkey X" disease) pour apprécier à une plus juste valeur le risque toxino-génèse posé par la contamination fongique. L'étude des causes de cette épidémie devait en effet conduire en peu d'années à la découverte de toxines importantes : les aflatoxines élaborées par une moisissure banale *Aspergillus flavus*. On s'aperçut que des moisissures peuvent synthétiser des substances toxiques, contaminant non seulement l'alimentation animale, mais également l'alimentation humaine.

En quelques années, les travaux réalisés sur de nombreuses espèces fongiques conduisaient à la caractérisation de plusieurs dizaines de composés toxiques nouveaux. Les premières espèces étudiées furent celles de la flore des champs et de stockage, puis on s'intéressa également aux espèces utilisées par les industries agroalimentaires. *Penicillium roqueforti*, moisissure intervenant dans l'affinage du fromage de Roquefort et de divers bleus, fut l'objet d'investigations des auteurs japonais (1), puis américain (2) qui découvrirent son aptitude à élaborer un composé toxique dénommé PR Toxine (PRT).

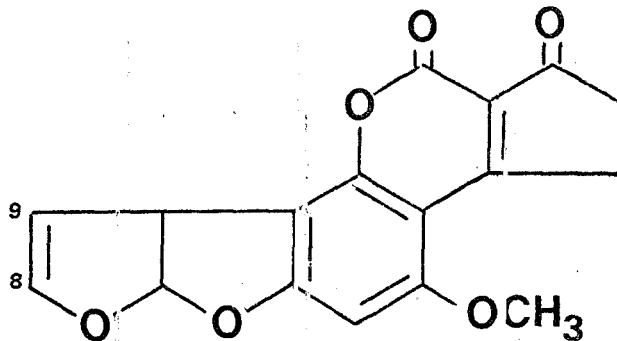
Ces travaux nous ont incités à entreprendre la recherche de la toxine dans des souches utilisées dans l'affinage du fromage et à rechercher d'autres métabolites toxiques éventuellement produits par *P. Roqueforti*.

Avant de présenter les résultats de nos travaux, nous examinerons, à titre d'exemple, les problèmes soulevés par la découverte de quelques myco-toxines majeures aujourd'hui bien connues.

LES AFLATOXINES

L'intoxication aiguë d'élevages de dindons en 1960 dans le sud de l'Angleterre, qui causera la mort de plus de 100.000 dindonneaux (3), a été la première mycotoxicose parfaitement caractérisée.

L'épidémie ne correspondait à aucun virus, aucun microorganisme ou aucune toxine connus à l'époque. Une étude systématique a révélé que le point commun entre les élevages contaminés était des tourteaux d'arachide provenant du Brésil et d'Afrique Orientale ou Occidentale. K. SARGEANT (4) et ses collaborateurs décelèrent dans ces tourteaux la présence d'un champignon contaminant : l'*Aspergillus flavus*. Ils démontrèrent que ce champignon produit une substance toxique pour le caneton, qui fut appelée aflatoxine. Cette toxine était extraite par le chloroforme des cultures de ce champignon. T. ASAO et al (5) caractérisait en 1963 les métabolites toxiques. Le plus important était l'aflatoxine B₁ (AFB₁).



Depuis de très nombreux travaux ont précisé l'impact de cette toxine en pathologie vétérinaire et humaine et élucidé le mode d'action de ce métabolite fongique qui devait s'avérer être un des plus puissants hépatocarcinogènes connus.

Nous examinerons brièvement les principaux aspects de l'intervention de l'aflatoxine dans la chaîne alimentaire. Elle constitue un bon exemple des problèmes que posent ces contaminants.

Suivant les mycologues, le terrain de prédilection de *A. flavus*, espèce cosmopolite, est l'arachide, mais la moisissure se développe également sur le blé, la farine, les pâtes alimentaires, le riz. Sa présence dans les aliments de bétail même en l'absence de tourteaux d'arachides, n'est donc pas fortuite. Peu d'espèces en dehors de *A. flavus* sont capables d'élaborer les

aflatoxines. On peut citer principalement *A. parasiticus*. La présence de *A. flavus* sur un substrat n'est pas suffisante pour démontrer un risque d'intoxication par les aflatoxines : en effet, toutes les souches de la moisissure ne s'avèrent pas capable d'élaborer cette toxine. Il faut également que certaines conditions de température et d'humidité favorables soient créées pour que le champignon synthétise ces métabolites. De même, l'absence de *A. flavus* sur un substrat n'élimine pas le risque de sa contamination par l'aflatoxine car la moisissure peut être disparue au moment de l'examen (pour l'ensemble de ces données voir la référence 6).

Grâce aux expérimentations animales, la pathologie des intoxications a été bien cernée. On a pu mettre en évidence également l'intervention de l'aflatoxine en pathologie humaine.

Ainsi, le syndrome de REYE est une affection qui frappe les enfants âgés de 1 à 7 ans en Thaïlande (7), et qui entraîne la mort en quelques jours. Ce syndrome est caractérisé par une dégénérescence graisseuse du foie et des viscères. Il semble bien que l'on puisse, à l'heure actuelle, l'attribuer à des mycotoxines du type aflatoxine pour trois raisons essentielles :

- l'analyse des aliments (riz principalement) a montré la présence de quantités importantes d'aflatoxines,
- l'analyse des pièces d'autopsie a révélé la présence de taux élevés d'aflatoxine dans le contenu stomacal et le foie des patients,
- l'administration d'aflatoxine à des macaques a permis de reproduire le syndrome humain.

Mais ce qui rend les aflatoxines particulièrement redoutables, c'est leur pouvoir cancérogène, l'ingestion répétée de faibles doses étant de toute évidence beaucoup plus difficile à contrôler que les contaminations massives responsables des accidents aigus.

La répartition géographique du cancer primaire du foie chez l'homme coïncide avec les zones de plus grand développement des moisissures : Afrique du Sud et Centrale, Inde du Sud, Japon. Aussi, dès que le pouvoir cancérogène des aflatoxines a été démontré avec certitude, l'hypothèse de leur intervention dans l'étiologie du cancer primaire du foie chez l'homme a été émise (8).

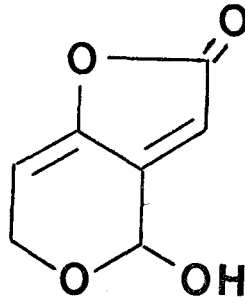
Le taux d'hépatomes le plus élevé s'observe au Mozambique (1°/‰) où cette forme de tumeurs peut représenter les 3/4 des cancers totaux. Ce taux élevé est essentiellement dû à des conditions d'environnement et non à des causes d'ordre génétique. Par exemple, dans un même pays, le taux de tumeurs est inversement proportionnel à l'altitude et varie donc dans le même sens que l'exposition des habitants à l'aflatoxine (les zones les plus sèches sont les moins contaminées par *A. flavus*) (9). Néanmoins, il faut tenir compte du taux important de cirrhose et d'hépatite (forme B) ainsi que d'une malnutrition endémique qui sont toujours associées à ces taux élevés d'hépatomes.

Bien que ces exemples ne constituent pas de preuves absolues d'intervention de l'aflatoxine en pathologie humaine, les informations obtenues sont impressionnantes.

Le mode d'action de l'aflatoxine B a été également étudié : l'AFB₁ inhibe la synthèse des protéines et des acides nucléiques (10) et se fixe sur l'ADN, l'ARN et les protéines (11). Des travaux réalisés simultanément par Y. MOULÉ et C. FRAYSSINET en France et R.C. GARNER (12) en Angleterre ont montré que l'AFB n'était pas active par elle-même, mais qu'elle devait être métabolisée par des microsomes hépatiques pour manifester ses propriétés biochimiques. Le dérivé actif n'a jamais été isolé, mais de nombreux auteurs ont suggéré qu'il pouvait s'agir de l'époxyde en 8,9 qui est instable. De fait, une époxydation de AFB₁ réalisée chimiquement (in situ) récemment faite par C.N. MARTIN et R.C. GARNER (13) lui confère une activité biologique comparable aux produits obtenus par métabolisation microsomale, c'est-à-dire dans le test utilisé, la fixation de AFB₁ sur l'ADN.

LA PATULINE

La patuline est une autre mycotoxine actuellement bien étudiée. Mais son histoire est un peu différente de celle de l'aflatoxine. Elle fut isolée pour la première fois par E. CHAIN en 1942 au cours de recherches d'antibiotiques élaborés par des champignons (14). Sa structure fut élucidée par R.B. WOODWARD en 1949 (15).



Cet antibiotique s'étant révélé trop toxique, son utilisation n'a jamais été envisagée. C'est en 1959, en France, que son intervention au cours d'une mycotoxicose fut envisagée. Dans une ferme de l'Ile de France, un troupeau de vaches laitières recevait comme nourriture de jeunes plantules de graines germées. Après quelques semaines de ce régime, les bêtes marchaient avec difficultés, le train arrière paralysé. Quelques bêtes devaient mourir par la suite. A l'examen des platules on isola un champignon *Aspergillus clavatus* qui s'est avéré capable d'élaborer une toxine : la patuline (16). De tels cas se produisirent également au Japon. Outre *A. clavatus*, la patuline est élaborée par *Penicillium patulum* à qui elle doit son nom, mais la source naturelle la plus abondante de patuline est *Penicillium expansum*, agent d'une pourriture des pommes. La patuline a été encore signalée dans divers jus de pommes (17).

La patuline est un antibiotique, mais sa toxicité pour les animaux de laboratoire et surtout son action mutagène chez la levure, ainsi que son pouvoir cancérogène chez le rat (18) ont empêché son utilisation en thérapeutique.

LES TRICHOHECENES

Sous le nom d'Aléucémie Toxique Alimentaire (ATA), les médecins russes ont décrit, depuis le début du siècle, une affection à allure endémique dont les manifestations ont été souvent particulièrement graves. Les premières observations rapportées ont été faites en Sibérie Orientale ; en 1932, la maladie s'étendit en Sibérie Occidentale, puis en Russie d'Europe. Apparemment, l'affection n'a jamais été reconnue en dehors du territoire de l'U.R.S.S.. La maladie se produisit avec une particulière gravité en 1942 et 1947, dans la population sibérienne. En 1944, 10% de la population était atteinte. Le taux de mortalité varie selon les endémies, en 1932, le taux atteint 60%. D'une façon générale, l'ATA frappe des groupes ruraux faisant des céréales produites localement la base de leur alimentation.

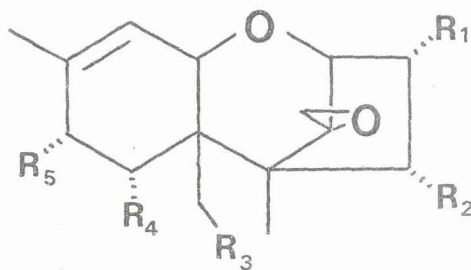
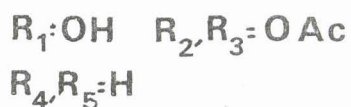
L'incidence de la maladie pouvait être rapportée aux conditions de vie très proches de la famine qui affectait ces populations à cette époque, les obligeant à consommer des grains ayant passé l'hiver sous la neige. L'ensemble des études poursuivies par les auteurs russes a été regroupé dans plusieurs revues bibliographiques (19).

L'étude de très nombreuses souches fongiques isolées de céréales, dont l'ingestion avait provoqué des accidents, a montré qu'une Toxinogénèse était expérimentalement décelable chez de nombreux *Fusarium* (19b). Les espèces *F. poae* et *F. sporotrichoïdes* furent les principales incriminées. Ces micromycètes sont capables de se développer à des températures comprises entre 0 et 4°C, ce qui explique leur prolifération au printemps sur des céréales non récoltées lorsque le dégel apparaît.

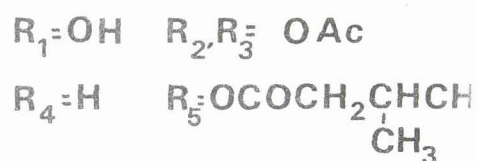
L.E. OLISON (20) a purifié, à partir de deux de ces champignons, deux hétérosides stéroïdiques : la poaefusarine et la sporofusarine. Avec ces métabolites, on reproduit chez le lapin principalement les nécroses de la peau de l'ATA.

Mais plus récemment Y. UENO (21) a isolé des cultures *in vitro* de ces deux *Fusarium* des substances de la classe des 12, 13 epoxytrichotécènes, métabolites déjà connus de divers *Fusarium*, *Trichothécium*, *Céphalosporium* : la T-2 toxine et le diacétoxyscirpénol :

Diacetoxyscirpénol



T2-Toxine



Les symptômes de l'ATA se sont révélés proches de ceux induits expérimentalement par le diacétoxyscirpénol chez le rat. Ces constatations conduisent à estimer que les 12,13 époxytrichothécènes jouent un rôle essentiel dans l'étiologie de l'ATA.

Le diacétoxyscirpénol a été caractérisé par P.W. BRIAN en 1961 de culture de *F. equiseti*, et la T-2 toxine de *F. tricinctum* par J.R. BAMBURG en 1968.

On connaît actuellement un peu plus d'une vingtaine de composés du type impliqué ici. Leur toxicité est assez élevée et les DL 50 sont inférieurs à 10 mg/Kg pour la plupart des espèces animales avec les composés les plus actifs.

Sur le plan biochimique, les trichothécènes sont des inhibiteurs particulièrement actifs de la synthèse protéique et de celle de l'ADN, tandis qu'ils sont sans action sur les synthèses d'ARN. Le point d'impact sur les mécanismes de la transcription se situe au niveau de l'élongation des chaînes (pour la T-2 toxine (22)).

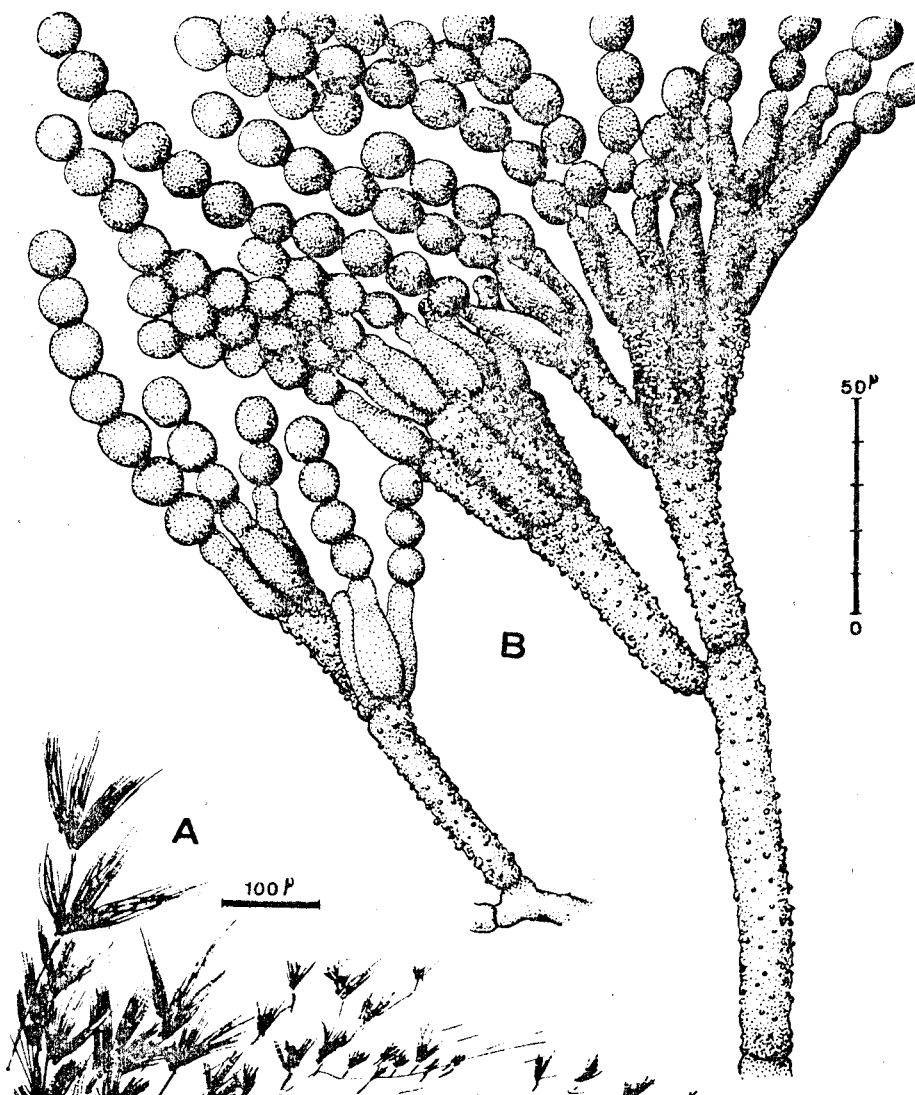
Ces trois exemples illustrent la nature des problèmes posés par les mycotoxines. A côté de ces cas d'espèces, on connaît maintenant de nombreux métabolites fongiques toxiques, isolés au laboratoire et dont l'impact dans la nature ou l'alimentation animale ou humaine n'est pas apparent. Néanmoins, leur connaissance ou la connaissance de leur condition d'élaboration permet une surveillance accrue des risques toxiques dans l'alimentation. Il est certain que seules les intoxications chroniques sont à prendre en compte dans l'alimentation humaine et il est évident, à ce niveau, que l'addition de contaminants d'origine fongique aux polluants atmosphériques, aux pesticides et aux divers agents de conservation alimentaire n'est pas à négliger. Il est certain qu'une vigilance de tous les instants est nécessaire pour asseoir sur des bases scientifiques la quiétude qui règne actuellement dans le domaine des mycotoxines dans les pays développés tels que le nôtre.

PENICILLIUM ROQUEFORTI

--0000000--

P É N I C I L L I U M R O Q U E F O R T I

THOM en 1906 fut le premier à présenter une description de la moisissure utilisée dans le fromage de Roquefort et à en démontrer l'importance dans sa fabrication (23). Le nom de *Penicillium roqueforti* Thom fut donc reconnu pour l'espèce directement impliquée dans la fabrication de fromage de type Roquefort.



Penicillium roqueforti Thom : A : aspects culturaux ; B : pinces (ref. 24)

Mais *P. roqueforti* n'est pas seulement une espèce isolée des fromages bleus, il fait partie de la flore d'ensilage et plus particulièrement du cortège fongique des maïs-fourrages (24).

Nous avons utilisé, pour notre étude, la souche répertoriée de THOM NRRL^{**} 849, diverses souches utilisées pour la fabrication de fromages qui nous ont été fournies par Monsieur M. JEMMALI (Service Mycotoxine I.N.R.A., Paris) et, enfin des souches isolées par le Professeur J. PELHATE à Brest de divers ensilages.

* Northern Regional Research Laboratory.

STRUCTURES DES SÈSQUITERPÈNES

DE P. ROQUEFORTI

--0000000--

STRUCTURES DES MÉTABOLITES

de *Penicillium roqueforti*

De nombreuses souches de *Penicillium roqueforti* semblent capables d'élaborer la PR Toxine. Nous avons, dans un premier temps, cherché à reproduire les travaux effectués par R.D. WEI (2,25) et pour cela utilisé la souche NRRL 849. Nous avons également retenu une souche B qui s'est avérée apte à élaborer la plupart des métabolites que nous avons caractérisés.

Ces souches sont ensemencées sur des tubes de gélose contenant de l'extrait de pomme de terre et du glucose. Les spores sont récoltées stérilement à partir de ces tubes et une suspension de ces spores est utilisée pour ensemencer le milieu de croissance du champignon.

Le milieu de culture est réalisé par addition dans de l'eau désionisée, de saccharose (150 g/l) d'extrait de levure (20 g/l) et de sels de potassium, magnésium, calcium, zinc, fer et manganèse. Il permet d'assurer un bon développement du champignon et une sporulation verte abondante.

Ce milieu est stérilisé soit à l'autoclave, soit par filtration sur membrane. Les cultures stationnaires sont réalisées dans des fioles de Roux de 1 litre contenant environ 150 ml du milieu et sont maintenues à l'obscurité à 25° pour des durées de 8 à 21 jours.

Au moment choisi, le contenu des fioles est filtré sous vide pour éliminer la masse mycélienne. Le milieu de culture est recueilli et soumis à une extraction.

L'extraction est réalisée au chloroforme dans des ampoules à décanter. L'extrait est concentré et séché.

L'extraction d'une centaine de fioles permet de récupérer un extrait brut huileux d'environ 3,5g. Cet extrait est analysé par CCM et purifié par chromatographie sur colonne de silice (élution par des mélanges chloroforme-méthanol).

L'extraction du milieu de culture de la souche NRRL 849 permet d'isoler dans l'ordre des polarités croissantes. La PR Toxine (PRT), l'érémofortine C (EC) et l'érémofortine D (ED). A partir de 100 fioles nous avons obtenu après cristallisation dans les solvants appropriés :

- 200 mg de PRT (éther éthylique) .
- 20 mg de EC (métabolite obtenu en quantité très variable, voir étude cinétique au chapitre suivant)
- 100 mg de ED (acétate d'éthyle)

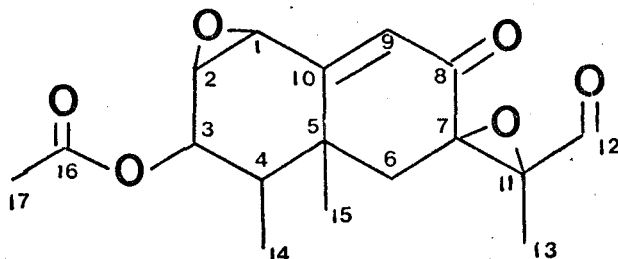
Dans le cas de la souche B on isole, à partir d'une centaine de fioles dans l'ordre des polarités croissantes après cristallisation :

- l'érémofortine A EA (70 mg)
- PRT (150 mg)
- l'érémofortine B EB (90 mg)
- EC (30 mg)
- ED (70 mg)

L'érémofortine E (EE) et la PR imine ont été isolées d'une culture de la souche NRRL 849 (100 fioles) qui s'est avérée au cours de cette expérience ne pas produire de PRT, mais accumuler deux métabolites plus polaires que ED. Nous avons isolé de cette seule expérience 90 mg de EE et 140 mg de PR imine (métabolite caractérisé dans la référence 25).

STRUCTURE ET STEREOCHIMIE DE LA PR TOXINE

La structure de ce métabolite a été réalisée par R.D. WEI (25).



PRT

Il s'agit d'un sesquiterpène bicyclique $M = 320$ caractérisé par la présence de nombreux groupements fonctionnels : aldéhyde, cétone α,β insaturée, époxydes, acétate.

Les caractéristiques spectrales de ce composé sont mentionnées dans les tableaux récapitulant l'ensemble des données spectrales des métabolites de *P. roqueforti*. (Voir Partie Expérimentale).

Les travaux de R.D. WEI ne mentionnant aucun aspect stéréochimique de cette molécule. Nous avons donc entrepris une telle étude à l'aide de la diffraction de rayons X. Notre but est de déterminer tant la stéréochimie relative, que la configuration absolue.

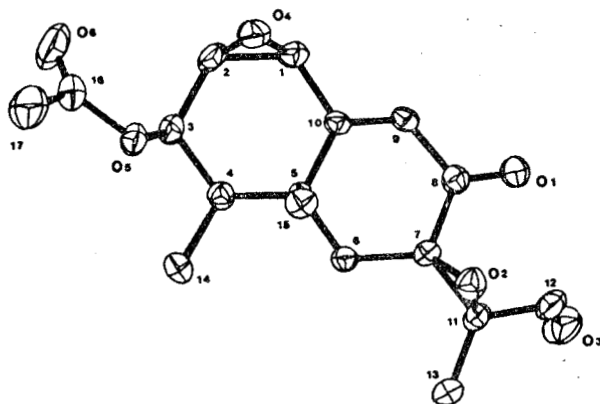
Les cristaux de PRT que nous avons obtenus par cristallisation dans l'éther éthylique présentent des caractéristiques physiques et spectrales identiques au composé de WEI.

Les mesures cristallographiques ont été effectuées par F. BAERT (26). Les cristaux sont orthorhombiques, le groupe spatial $P2_12_12_1$ et les dimensions de la maille $a = 13,999 \text{ \AA}$, $b = 12,360 \text{ \AA}$, $c = 9,664 \text{ \AA}$. La valeur finale du R est de 4,6%

La configuration absolue a été déterminée par une étude de diffusion anormale de RX. Nous avons essayé de synthétiser un dérivé de PRT possédant en position 3 un groupement p.Bromo Benzoate. Nous n'avons pu obtenir de cristaux permettant une analyse par RX de ce dérivé : nous nous sommes donc orientés vers l'étude par diffusion anormale de l'atome d'oxygène sur PRT même.

Les données complètes de cette étude figurent dans la publication jointe.

La structure absolue obtenue est celle indiquée ici :

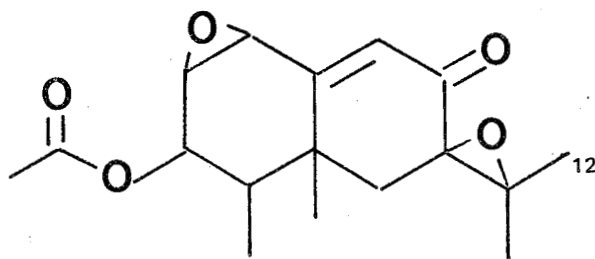


Cette stéréochimie est caractérisée par une position cis des deux méthyles C-14, C-15, en configuration β . De même, les époxydes C-1, C-2 et C-7, C-11 sont de configuration β .

Cette stéréochimie correspond à la série sesquiterpénique éremophilane (-27).

STRUCTURE DE L'EREMOFORTINE A EA

EA cristallise sous forme d'une poudre blanche de point de fusion 159-161°C. La structure de ce composé ne diffère de PRT qu'au niveau du carbone 12

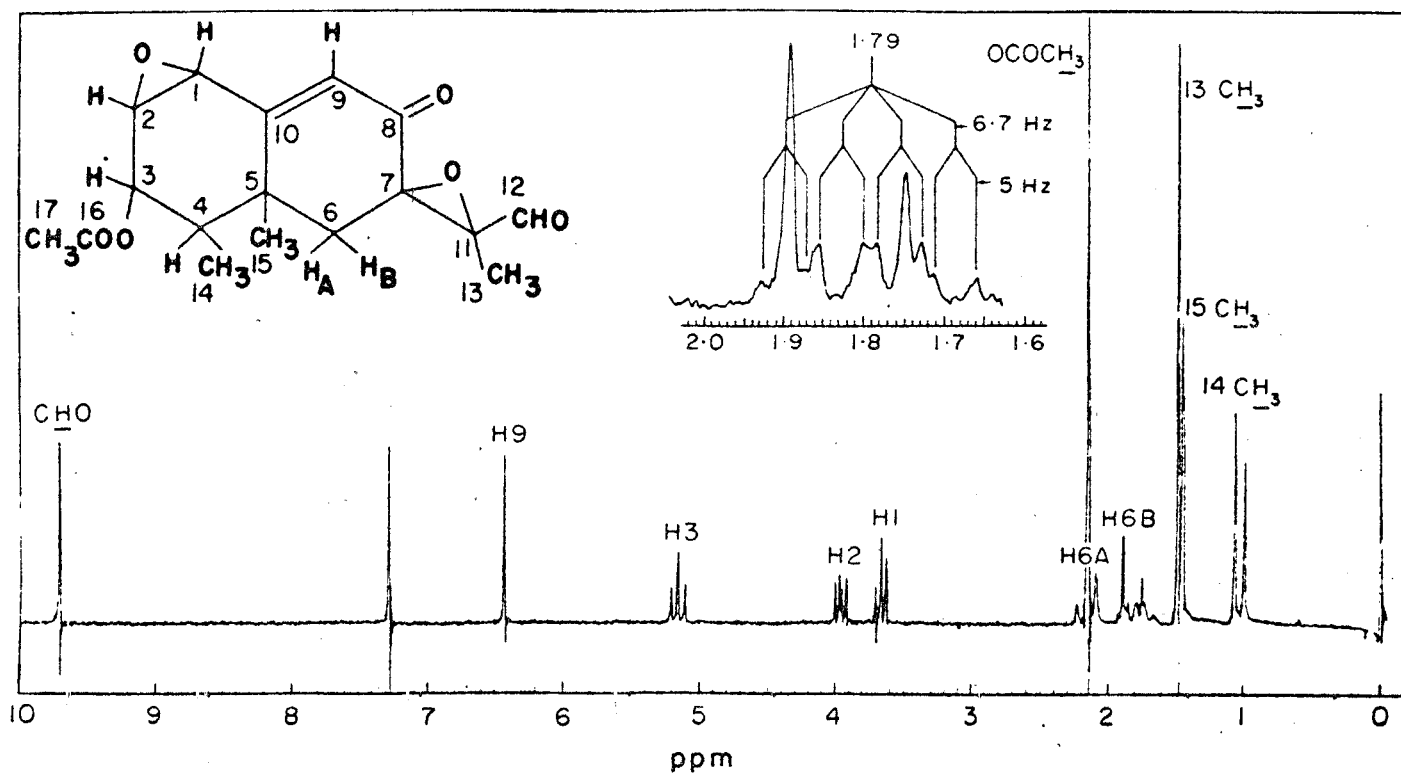


EA

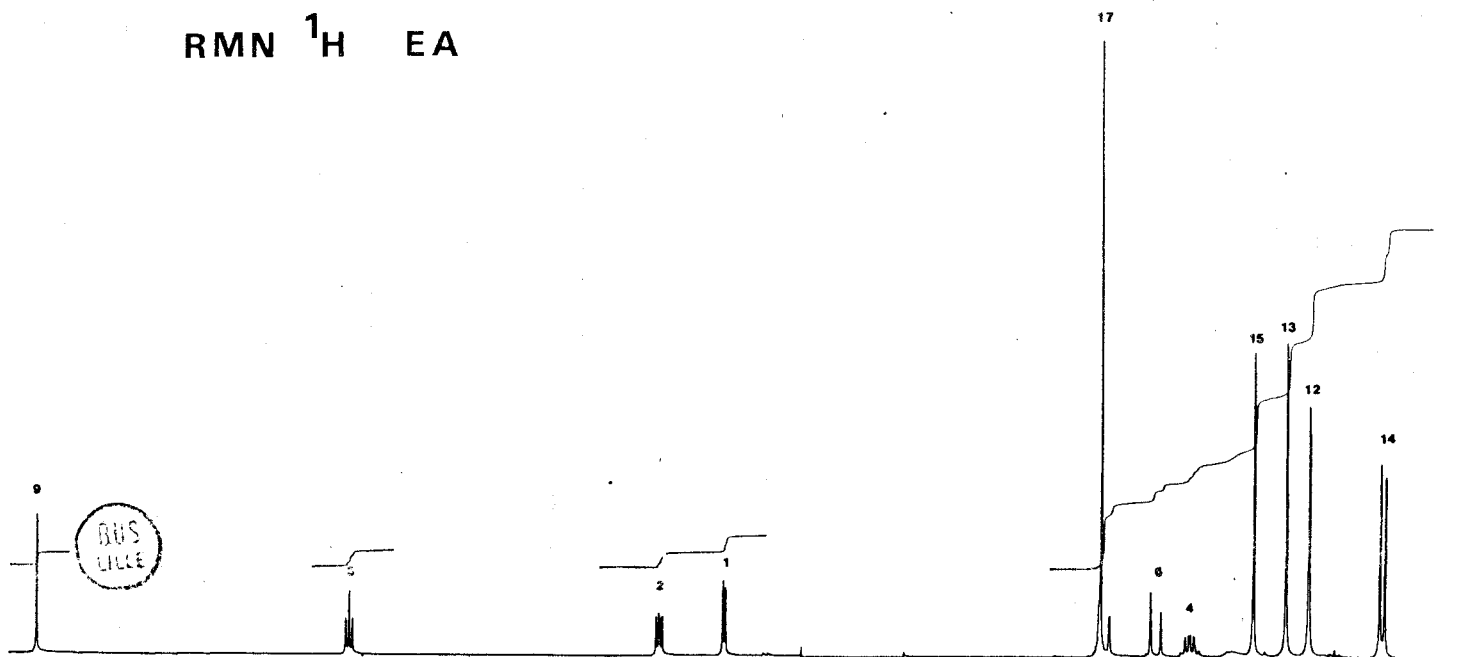
La fonction aldéhyde est remplacée par un radical méthyle.

Le spectre de masse haute résolution ($M^+ = 306,14663$) est en parfait accord avec le formule brute : $C_{17}H_{22}O_5$ (calculé : 306,14671).

The structure of PR toxin



RMN ¹H EA



La présence d'une cétone α,β éthylénique peut être déduite du spectre U.V. (λ_{\max} 246 nm, ϵ 14.700), et du spectre I.R. (ν_{CO} 1670 cm^{-1} , ν_{CC} 1620 cm^{-1}). On décèle également en I.R. un groupement acétate (ν_{CO} 1740 cm^{-1}).

Le spectre de R.M.N. ^1H (360 MHz) présente de grandes analogies avec celui de PRT (voir page ci-contre): le signal à $\delta = 9,75$ ppm (H aldéhydique) de PRT disparaît et on note un méthyle supplémentaire tertiaire à $\delta = 1,32$ ppm.

L'attribution des divers signaux se fait sans ambiguïté.

$\delta = 1,01$ ppm	CH_3 -14, d, $J = 7$ Hz	(couplage avec H-4)
$\delta = 1,32$ ppm	CH_3 -12, s	
$\delta = 1,40$ ppm	CH_3 -13, s	
$\delta = 1,52$ ppm	CH_3 -15, s	
$\delta = 1,79$ ppm	H-4 quadruplet dédoublé	$J_1 = 7$ Hz $J_2 = 5$ Hz

L'irradiation à $\delta = 1,01$ ppm transforme le quadruplet en doublet ($J = 5$ Hz).

$\delta = 1,92$ ppm	H-6A (proton axial en 6) d, $J = 15$ Hz
---------------------	---

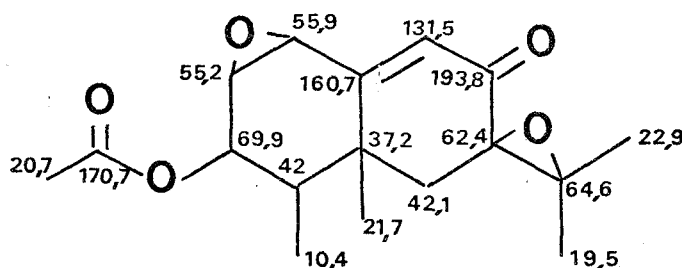
Couplage géminial avec H-6B

$\delta = 2,14$ ppm	H-6B, d; $J = 15$ Hz	
$\delta = 2,15$ ppm	CH_3 -17, s	
$\delta = 3,77$ ppm	H-1, d, $J = 3,5$ Hz (couplage avec H-2)	
$\delta = 3,9$ ppm	H-2, doublet dédoublé	$J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz

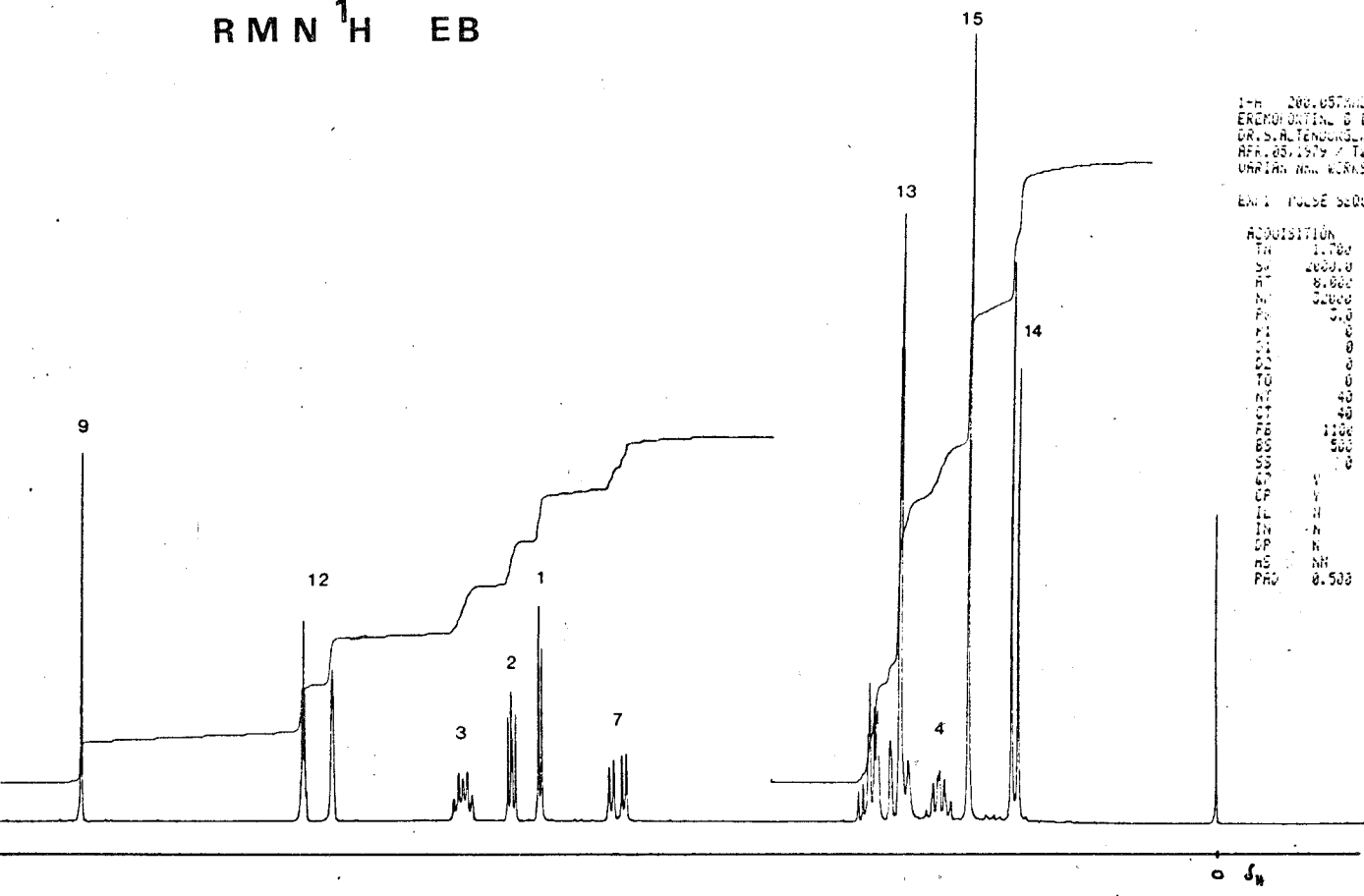
Couplage avec H-3 et H-1

$\delta = 5,12$ ppm	H-3, t, $J = 5$ Hz (couplage H-2, H-4)
$\delta = 6,25$ ppm	H-9, s

Le spectre de R.M.N. ^{13}C (25,2 MHz) présente 17 pics. La multiplicité observée dans le spectre off-resonance, la comparaison avec tous les autres métabolites obtenus, ainsi que les marquages au ^{13}C réalisée au cours de l'étude de la biosynthèse (voir chapitre Biosynthèse, p. 94), permettent de proposer l'attribution de la presque totalité des signaux.



RMN¹H EB



1-H 200.057400
 ERENHONTINE D EC15H20O3
 DR. S. A. TENENBERG, PARIS
 APR. 05, 1979 / 14
 URBAIN HALL WORKSHOP 20-101

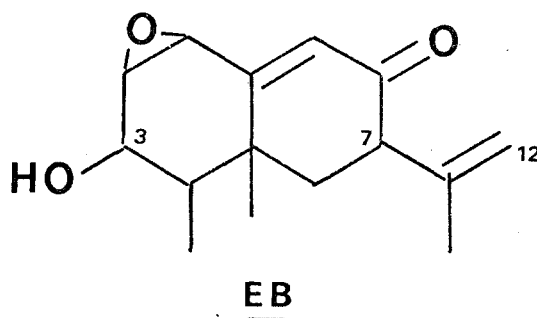
EX 1 PULSE SEQUENCE: SPC

ACQUISITION		PULS. & CT	
TR	1.700	ON	1.700
SP	2000.0	PO	511.1
RT	8.000	QA	KN
NI	32000	QW	S
PR	3.0	QX	200
PI	0	QY	N
SI	0	QZ	15
SD	0	OTL	20.0
TD	0		
NT	40	PROCESSED	
CT	40	FN	32708
FB	1100	ANTR	1
BS	500		
SS	10	DISPLAY	
CP	V	SP	-100.9
CF	V	WT	2000.0
IL	N	US	200
IN	N	SC	0
OP	N	WC	400
NS	NH	IS	40
PR	0.500	RFL	100.9
		XFP	0
		TH	20
		INS	1
		LC	



STRUCTURE DE L'EREMOFORTINE B EB

L'érémofortine B est un composé cristallisé de masse $M^+ = 248$ en S.M.. L'analyse élémentaire C 72,53%, H 8,06%, est en bon accord avec la formule $C_{15}H_{20}O_3$ (calculé C 72,55%, H 8,12%). La structure proposée repose sur les caractéristiques spectrales :



Le spectre U.V. présente toujours l'absorption caractéristique d'une cétone α, β éthylénique : λ_{\max} 249 nm, $\epsilon = 15\ 800$. Le spectre I.R. indique la présence d'un groupement OH (3520 cm^{-1}) d'une cétone conjuguée à une double liaison (1670 et 1620 cm^{-1}).

Le spectre R.M.N. du proton (200 MHz) présente également des analogies avec ceux des composés EA et PRT (voir page ci-contre). On peut noter en particulier l'absence d'un signal de méthyle d'acétate (à $\delta \sim 2$ ppm) et par contre la présence d'un proton échangeable avec D_2O ($\delta = 2,62$ ppm). La présence en 3 d'une fonction hydroxyle s'observe également par le déplacement paramagnétique d'un proton H-3 ($\delta = 4,12$ ppm) par comparaison au proton H-3 de EA et PRT ($\delta = 5,12$ ppm).

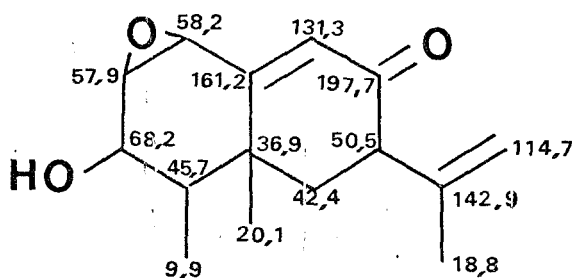
Le signal à $\delta = 1,72$ d'intensité correspondant à 3H est caractéristique d'un méthyle sur double liaison. On observe sur ce signal une multiplicité due à un couplage à longue distance, l'allure est un doublet dédoublé la largeur totale du multiplet est $J_1 + J_2 = 2,2$ Hz.

Les deux multiplets d'intensité 1H à $\delta = 4,84$ et 5 ppm sont attribués à deux protons vinyliques (H-12). Les multiplicités observées sont dues aux couplages vinyliques et allyliques avec les protons environnants.

Le signal à $\delta = 3,26$ ppm donnant un doublet dédoublé $J_1 = 14$ Hz, $J_2 = 5$ Hz, est attribué au proton H-7 qui est couplé aux protons H-6 par une constante $J_{a,a}$ et $J_{a,e}$. Ce proton est donc axial, la chaîne isopropényle en 7 étant

équatoriale. Une irradiation en H-7 perturbe l'ensemble des signaux entre 1,8 ppm et 2,7 ppm (O-H plus protons H-6). Les signaux des protons H-1, H-2, H-4 résonnent aux valeurs observées pour la série des métabolites et présentent les mêmes multiplicités.

Le spectre R.M.N. ^{13}C de EB (25,2 MHz) présente 15 raies. La multiplicité observée dans le spectre off resonance, la valeur des déplacements chimiques sont en accord avec la structure proposée.

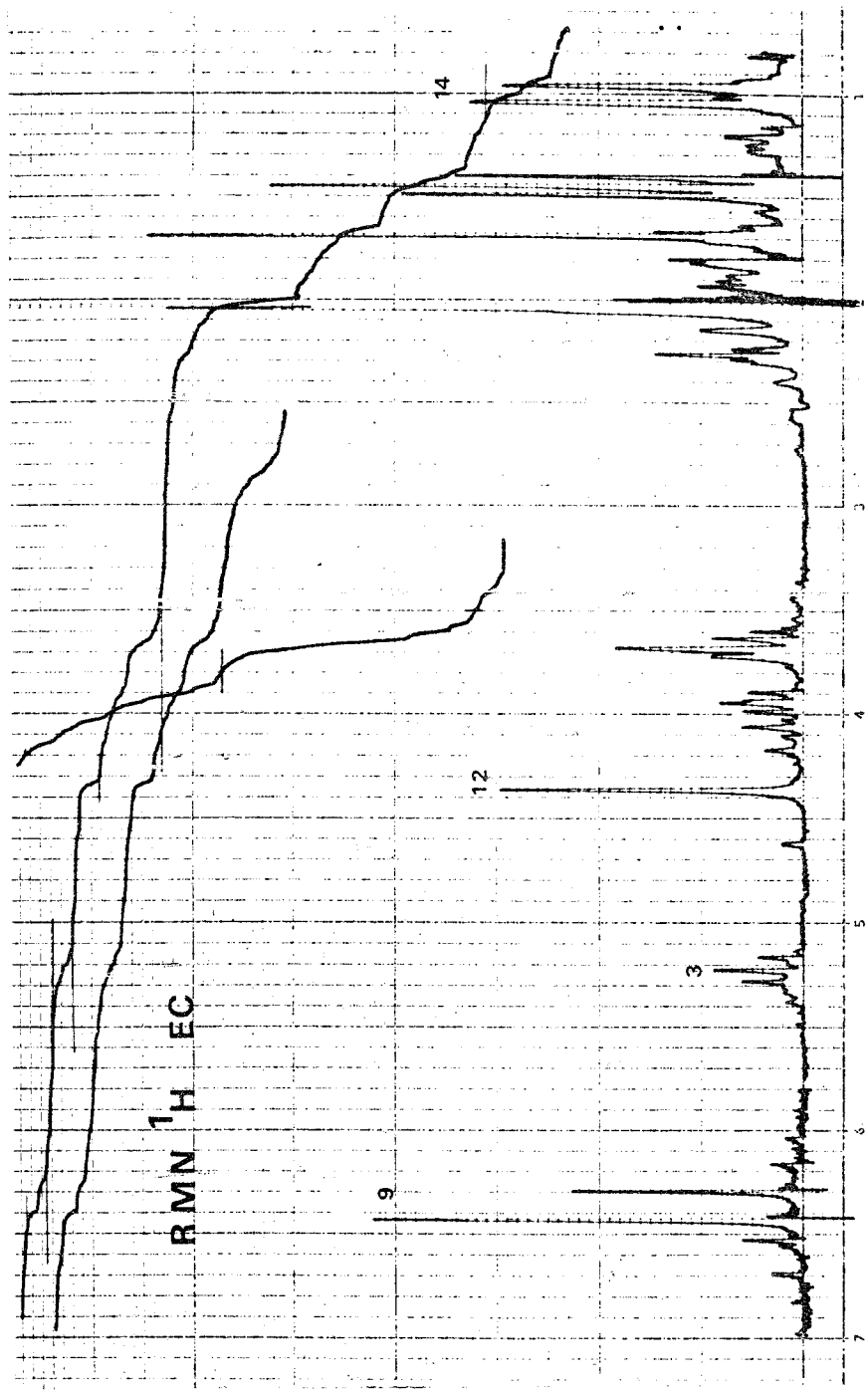


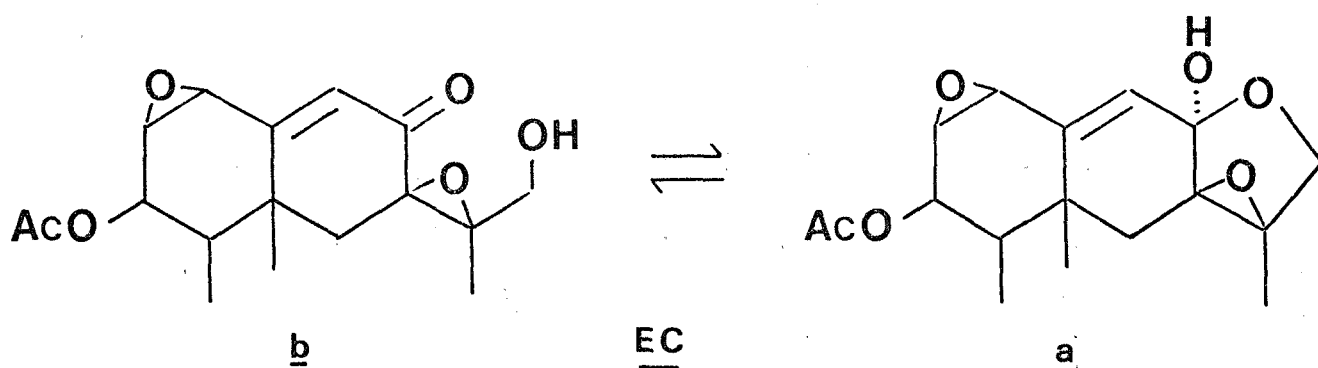
STRUCTURE DE L'EREMOFORTINE C EC

Ce composé cristallisé (PF 122-126°C) présente une masse de 322. Le spectre de masse haute résolution donne un ion moléculaire à 322,14161 (calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6$: 322,14163).

Le spectre I.R. indique la présence d'un groupe hydroxyle (3420 , 3350 cm^{-1}), une cétone α,β insaturée (1685 cm^{-1}), d'une double liaison isolée (1650 cm^{-1}) et d'une double liaison conjuguée (1620 cm^{-1}).

Le spectre R.M.N. du proton (90 MHz) complexe apparaît être la superposition de deux produits (voir ci-contre), dont les structures sont proches de PRT et EA. La structure proposée, est figurée à la page suivante.





Cette structure est un équilibre entre deux formes d'un même composé. Cet équilibre suggéré par les données de R.M.N. du proton a été vérifiée par une étude en R.M.N. à température variable. Le rapport des intensités de signaux des protons H-9a et H-9b résonnant à 6,02 et 6,44 ppm respectivement, a été mesuré à des températures comprises entre 20°C et 95°C (solvant : pyridine deutériée).

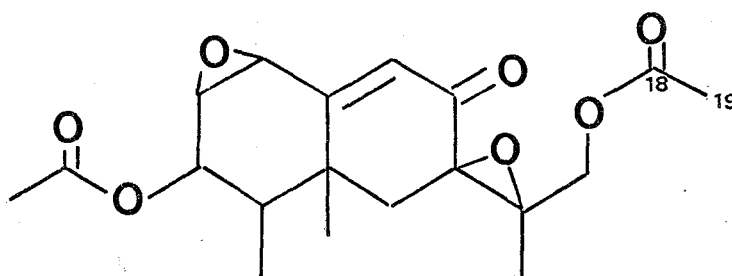
Le tableau suivant indique la pourcentage de la forme b présente à différentes températures :

θ	20°C	35°C	50°C	65°C	80°C	95°C
% de b	61	67	69	73	77	79

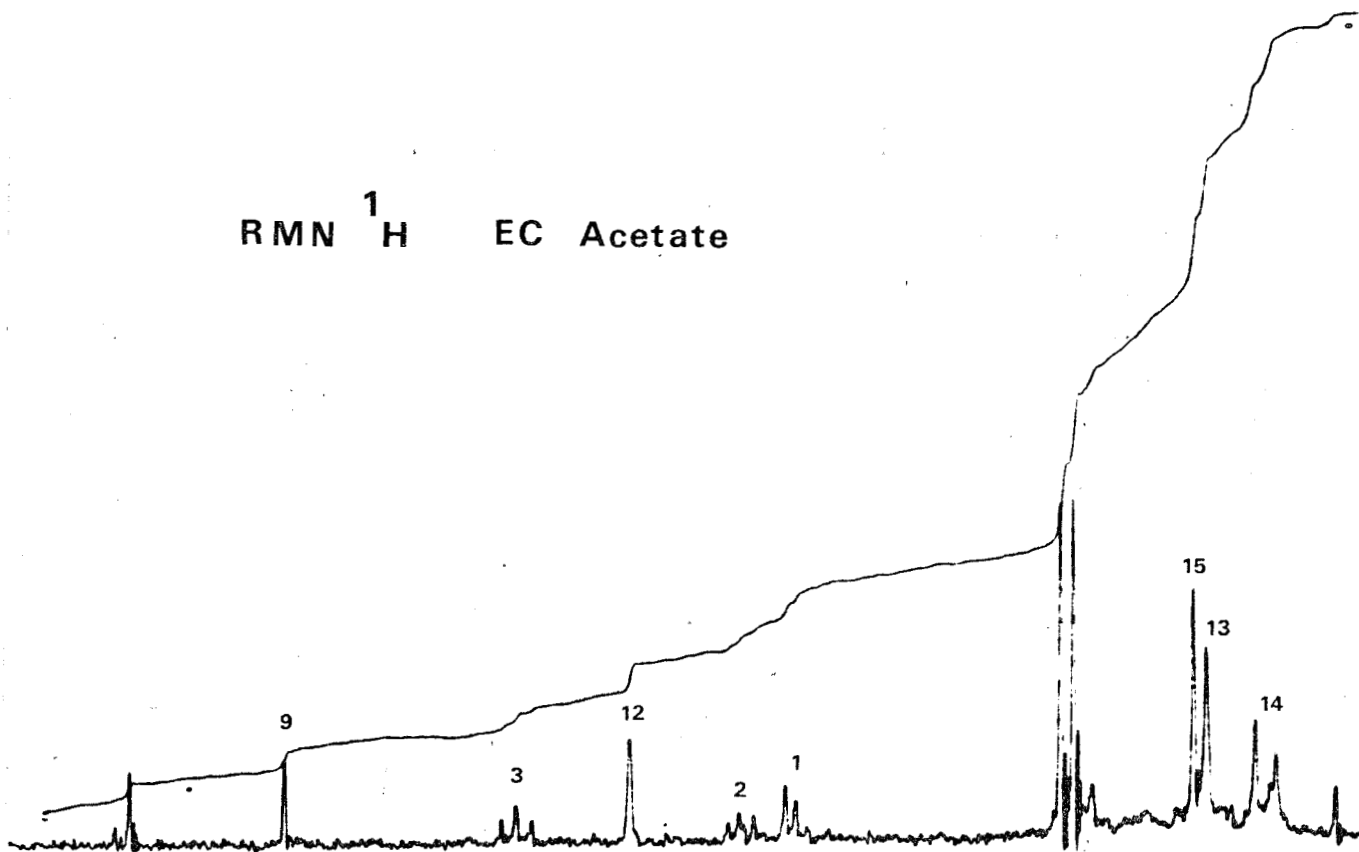
Une augmentation de la température semble favoriser la forme b ouverte. Le retour à la température ordinaire permet de retrouver le pourcentage de départ.

La structure a été confirmée par les réactions suivantes :

- La réaction par le borohydrure de sodium de la PRT permet d'isoler un composé cristallisé dont le comportement en CCM, les données spectroscopiques (I.R., R.M.N. ¹H, S.M.) montrent que ce composé est identique à EC isolé naturellement. On observe le même équilibre entre deux formes.
- L'acétylation de EC donne un composé cristallisé (PF 122-124°C). Sa structure est déduite des caractéristiques spectrales :



RMN ¹H EC Acetate

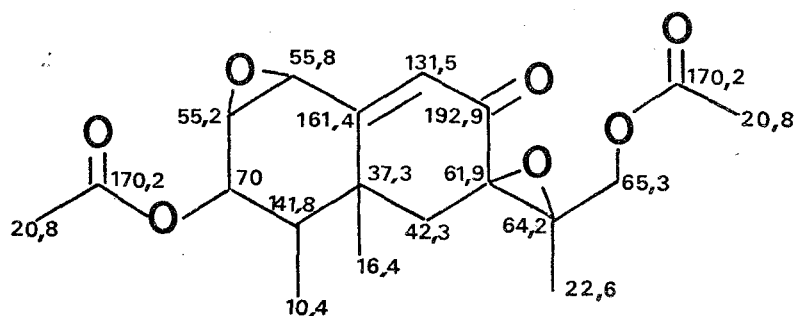


Le spectre U.V. (λ_{\max} 248 nm, $\epsilon = 16960$) indique la présence de la cétone α,β insaturée.

Le spectre I.R. ne montre plus la bande alcool, ni la bande à 1650 cm^{-1} (double liaison isolée) que présentait le spectre de EC. Par contre, la fonction acétate supplémentaire introduite se traduit en I.R. par un élargissement de la bande à $1745\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$. La cétone α,β éthylénique absorbant à 1685 cm^{-1} .

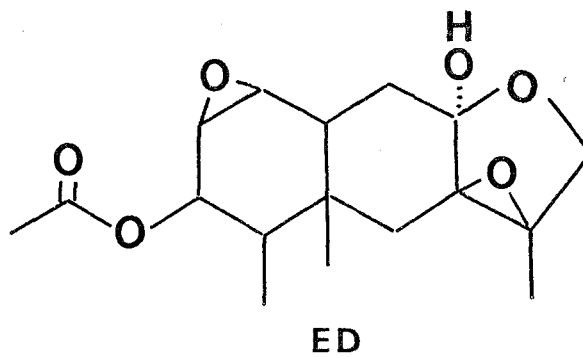
Le spectre R.M.N. du proton s'est simplifié et présente l'allure caractéristique des composés de cette série (voir ci-contre) ; on y remarque la présence de deux fonctions acétate. Les valeurs des déplacements chimiques des divers protons sont en accord avec la structure (voir tableau de la partie expérimentale).

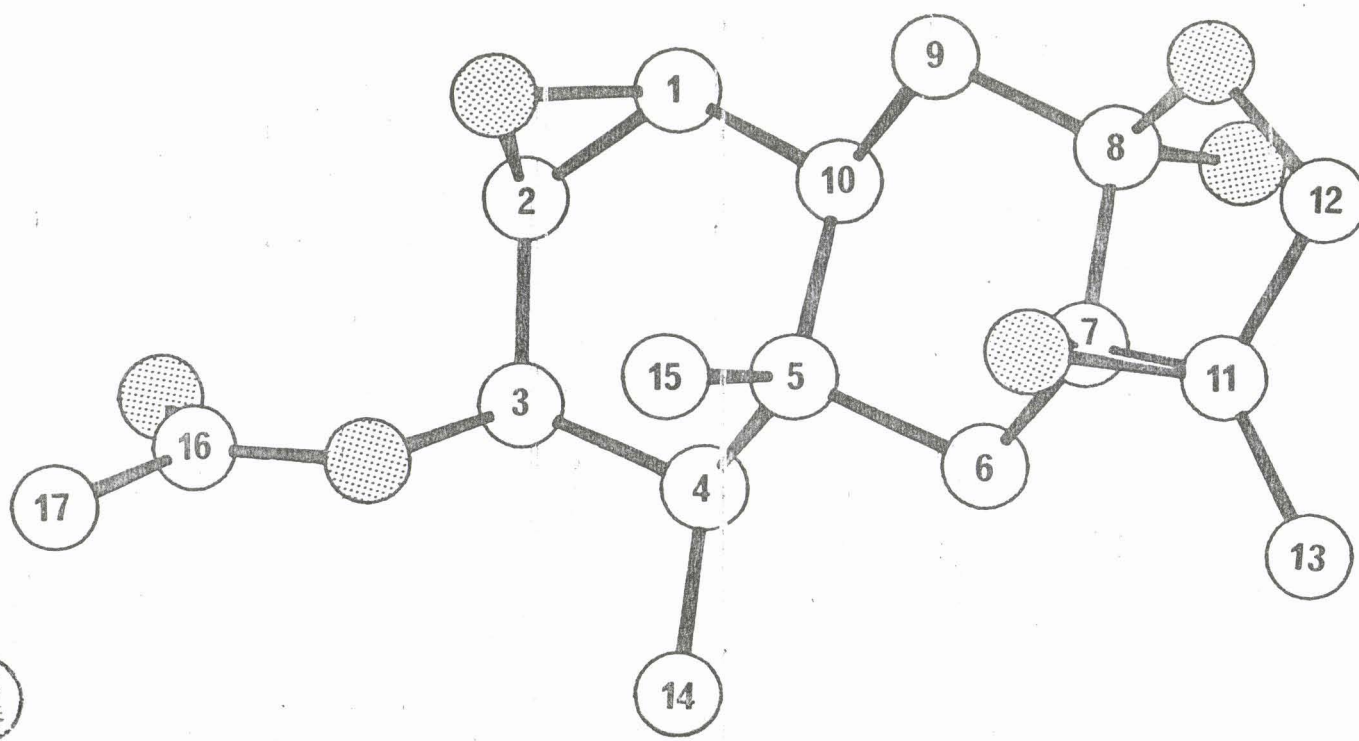
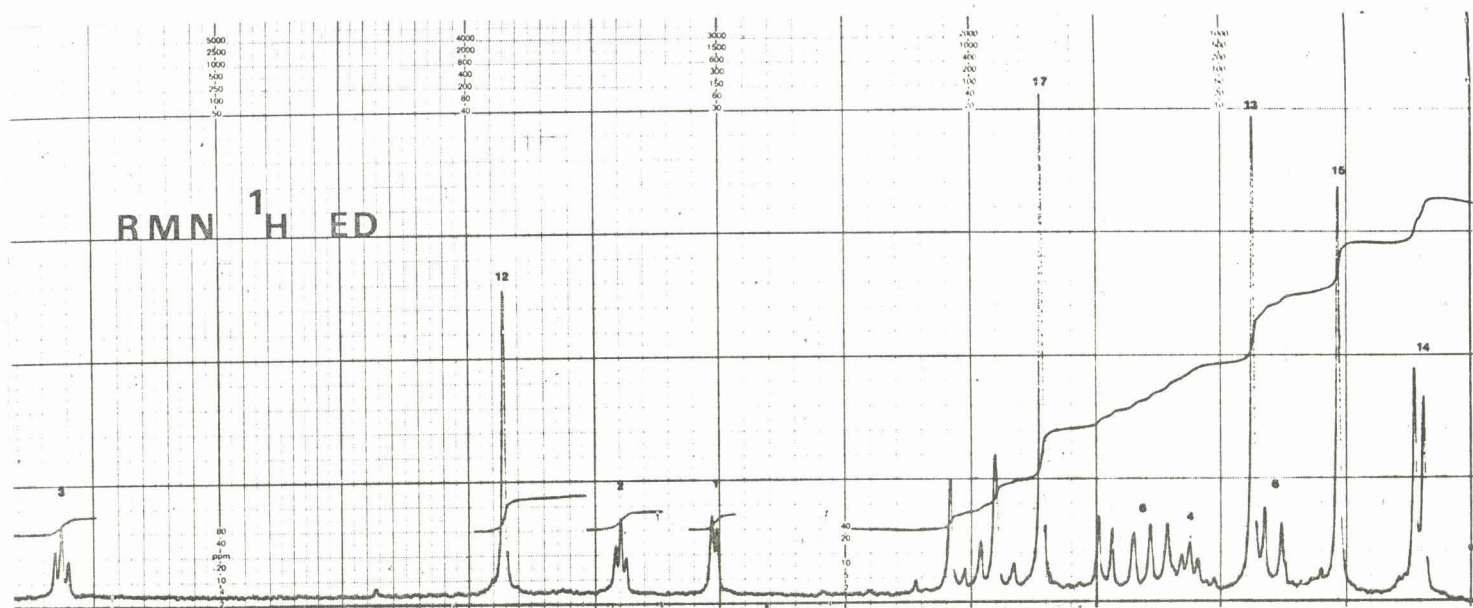
Le spectre R.M.N. ^{13}C (17 raies) permet de confirmer cette structure.



STRUCTURE DE L'EREMOFORTINE D ED

ED est un composé cristallisé blanc (PF $209\text{-}211^\circ\text{C}$). Sa structure a été étudiée par les méthodes spectroscopiques usuelles (78), et a été confirmée par une étude en diffraction de RX (79) :





BUS
LILLE

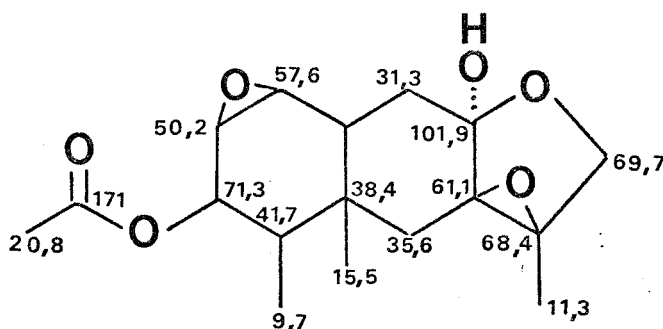
Stereochimie ED

C'est un composé de masse 324 et de formule brute $C_{17}H_{24}O_6$.

Le spectre I.R. montre la présence de la fonction hydroxyle (3420 cm^{-1}) et acétate (1735 cm^{-1}).

Le spectre de R.M.N. du proton possède l'allure générale de la série érémodifortine. Les attributions sont données dans le tableau de la partie expérimentale et reposent sur des expériences de double irradiation, dans le cas des protons H-4, H-6_A et H-6_B.

Le spectre R.M.N. ^{13}C (25 HMz) présente 17 pics. Leurs attributions reposent sur la multiplicité observée en off-résonance et la comparaison entre les diverses érémodifortines :



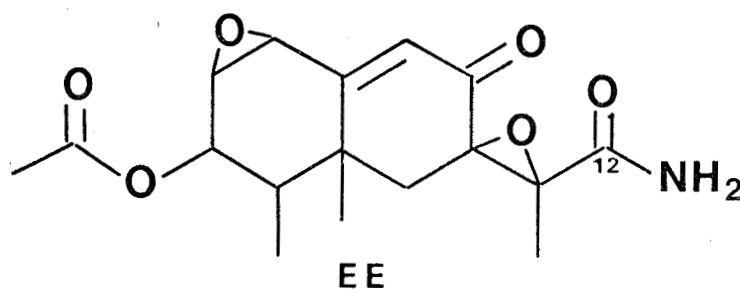
Sur le plan stéréochimie relative, l'étude en R.X. permet de constater que :

- les jonctions des cycles sont trans,
- les deux méthyles C-14 et C-15 sont en position cis,
- les groupes époxydes sont également sym par rapport aux méthyles,
- la chaîne latérale en 7 est donc en trans par rapport aux méthyles C-15. On donne habituellement le nom Valencane à la classe sesquiterpénique correspondant à cette géométrie (28), néanmoins strictement ce nom est donné à une configuration absolue déterminée : méthyles C-14, C-15 α et chaîne latérale en 7, β .

STRUCTURE DE L'EREMOFORTINE E EE

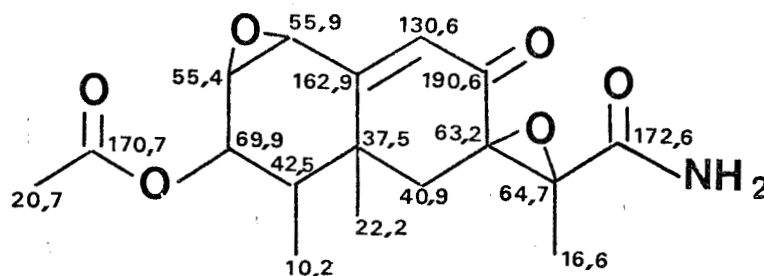
Ce composé n'a pu être isolé qu'au cours d'une seule série de cultures. C'est un composé cristallisé blanc (F 240°C, dec.).

La structure proposée repose sur les données spectroscopiques. La faible quantité disponible nous a incité à la confirmer par une étude en diffraction de R.X..



Le remplacement de la fonction aldéhyde de la PRT par une fonction amide dans EE repose sur les données suivantes :

- En R.M.N. ¹H (60 HMz), le proton aldéhydique à 9,75 ppm disparaît. On voit apparaître deux massifs (1-H d'intensité) à 5,6 et 6,1 ppm échangeable avec D₂O que l'on attribue à NH₂.
- Le spectre R.M.N. du ¹³C (15 MHz) très proche de celui de PRT, présente un singulet à 172,6 ppm caractéristique de la fonction amide :



- Le spectre I.R. (KBr) présente des bandes NH (3480 cm⁻¹ fine et 3160 cm⁻¹ larges et multiples). 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)

L'analyse en spectrométrie de masse ne permet pas de détecter la présence de l'azote. Le pic parent m/e 318 correspond à M^+-17 (NH_3). La mesure en haute résolution donne pour M^+-17 318,1109. Calculé pour $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$: 318,1103.

Le spectre U.V. confirme la présence de la cétone α,β éthylénique.
 λ_{max} 250 nm ($\epsilon = 15720$).

L'analyse par diffraction de R.X. permet de confirmer totalement la structure proposée. Elle a été réalisée par F. BAERT.

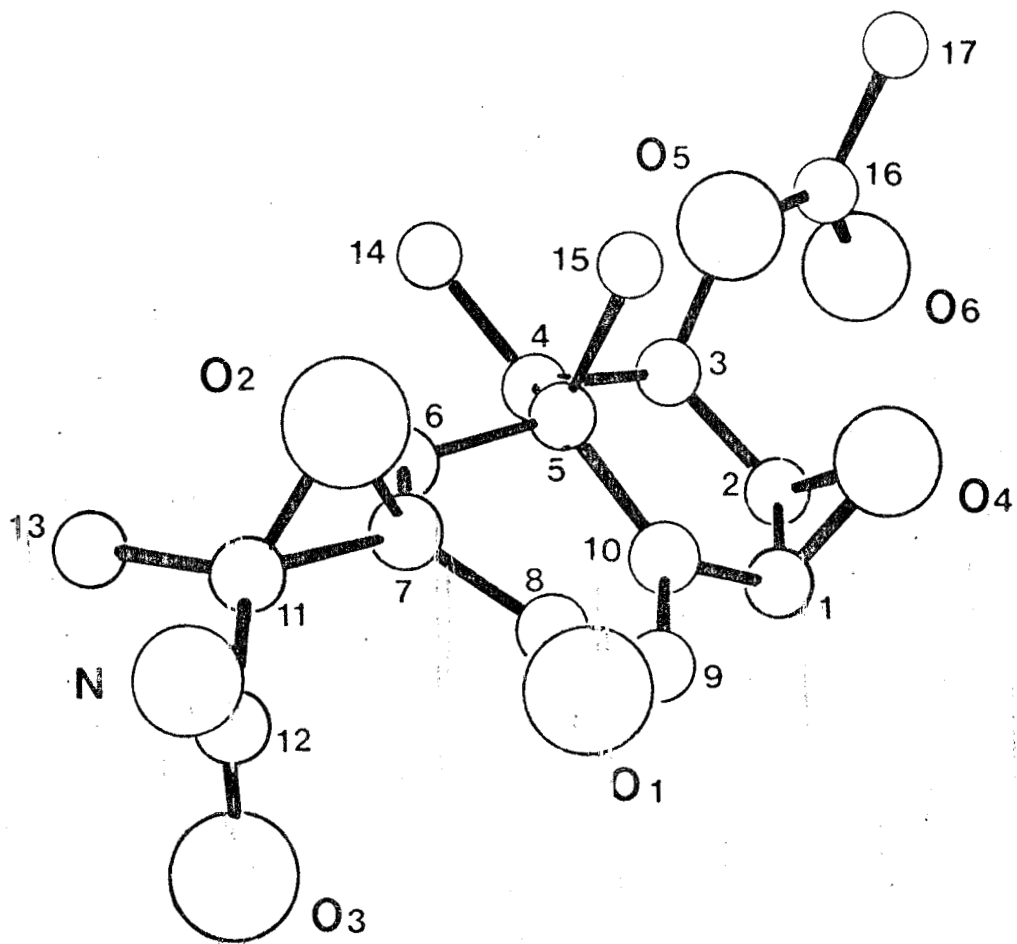
L'enregistrement de 1339 réflexions a été réalisé au diffractomètre automatique équipé d'une cathode au cuivre. La structure a été résolue par les méthodes directes utilisant le programme MULTAN. La valeur finale du coefficient de véracité est $R = 4,31\%$.

La maille est monoclinique. Ses paramètres sont : en Å $a = 13,520$;
 $b = 8,016$; $c = 7,923$.

Les angles $\alpha = \gamma = 90^\circ$; $\beta = 102,91^\circ$

Le groupe spatial est $P2_1$.

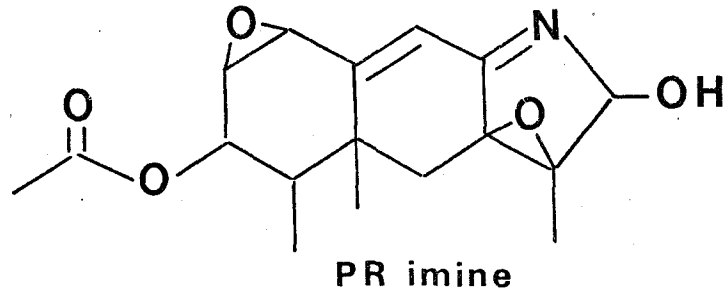
La structure est indiquée sur la figure ci-contre. Il s'agit d'un dérivé amide de PRT.



Erémofortine E

STRUCTURE DE LA PR IMINE

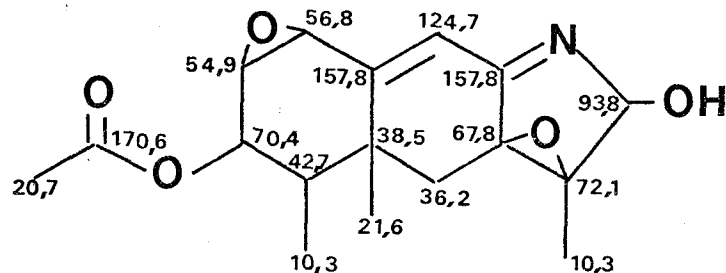
La PR imine est un composé déjà caractérisé par R.D. WEI (25).



Il résulte de l'action de l'ammoniaque sur PRT.

Nous avons isolé ce même composé de la série de cultures qui nous a également permis d'isoler EE. Nous avons comparé les propriétés physiques et spectrales du composé naturel et du composé de synthèse. Elles sont en tous points identiques : point de fusion (214°C), (le point de fusion de mélange ne montre aucun abaissement notable). Les pouvoirs rotatoires (α)_D sont identiques (+ 315°). Les courbes de dispersion rotatoire, de dichroïsme circulaire, de ces deux composés sont superposables. Les données de R.M.N. du proton figurent au tableau de la partie expérimentale.

Les attributions en R.M.N. du ¹³C sont représentées ci-dessous :



ETUDE STEREOCHIMIQUE DE LA SERIE

Nous avons étudié, dans le chapitre relatif à la structure de PRT, la stéréochimie absolue de ce composé. La complexité des courbes de dispersion rotatoire et des effets dichroïques nous a incité à entreprendre cette détermination par étude de diffraction R.X..

Nous pouvons donc, sur la base de cette étude, en étendre les conclusions aux autres métabolites, en comparant leurs courbes de dispersion rotatoire (DR) et de dichroïsme circulaire (DC).

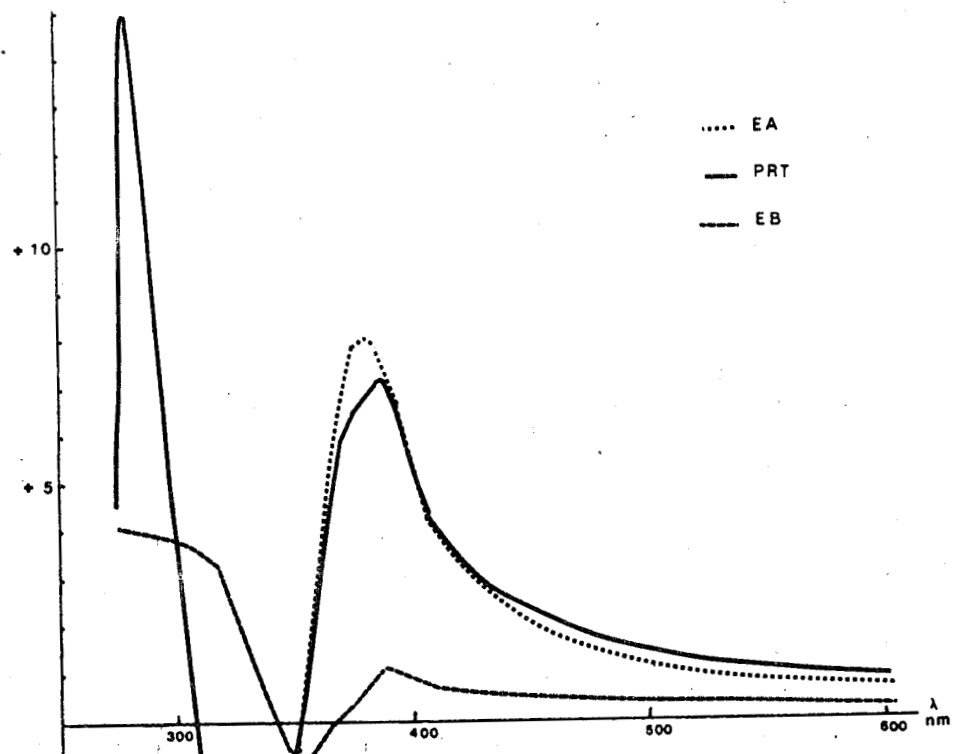
Les courbes de DR (ci-joint) montrent toutes un effet coton positif net pour la transition $n-\pi^*$ (bande R) des systèmes cétones α,β insaturées. Il est donc permis d'affirmer que la configuration absolue de l'ensemble de ces métabolites est identique et est celle de PRT (fig. page).

La complexité des vagues de DC de ces métabolites 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 double liaison). La règle des octants proposée par SNATZKE (29) 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 la fonction époxyde en 7-11 (comparaison entre les courbes de EA, PRT, EC acétate, EE d'une part et EB d'autre part). Tous les composés possédant la fonction époxyde montrent un effet dichroïque nettement positif associé à la bande R. Par contre, EB possédant une double liaison en β,γ du carbonyle montre dans cette même région un effet dichroïque multiple d'amplitude faible difficile à interpréter. Cet effet pourrait résulter d'interactions électroniques entre la cétone insaturée et la double liaison en $\beta\gamma$ (30) ; effets moins sensibles en DR (existence d'inflexions aux environs de 370 nm en DR de EB).

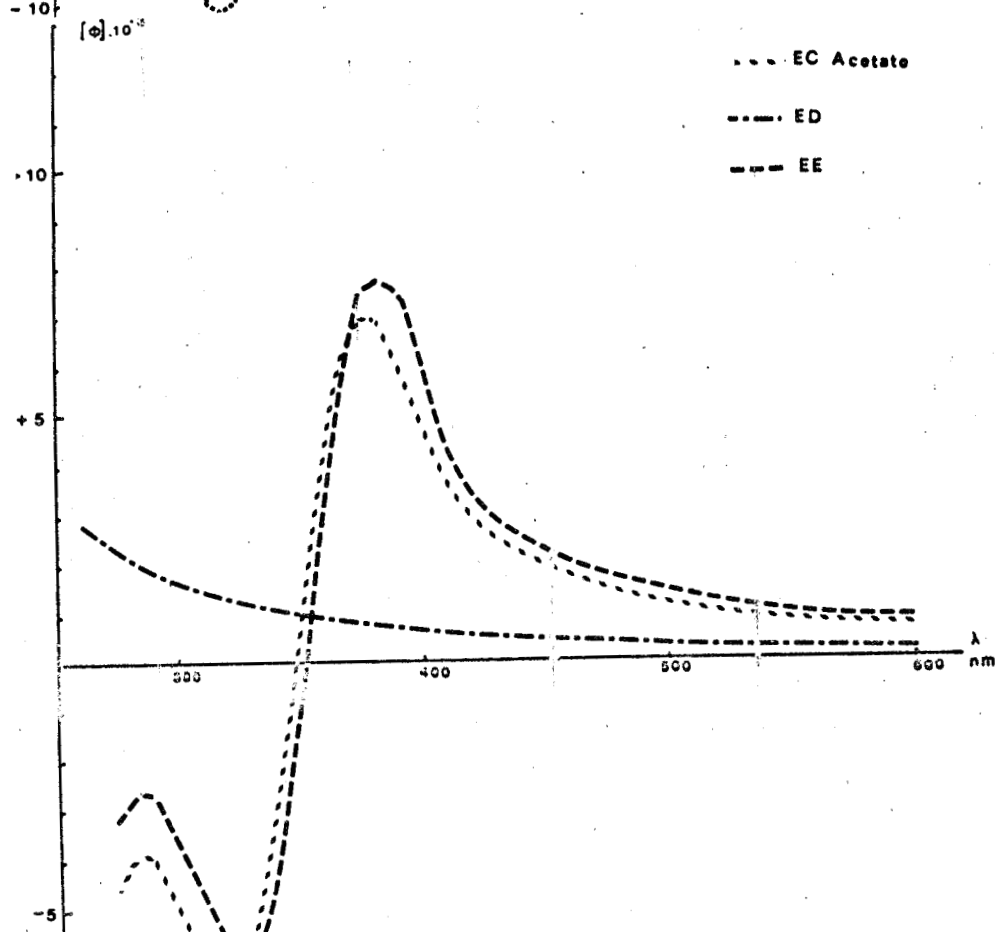
La stéréochimie absolue de cette série est donc caractérisée par une configuration cis et β des méthyles C-14 et C-15.

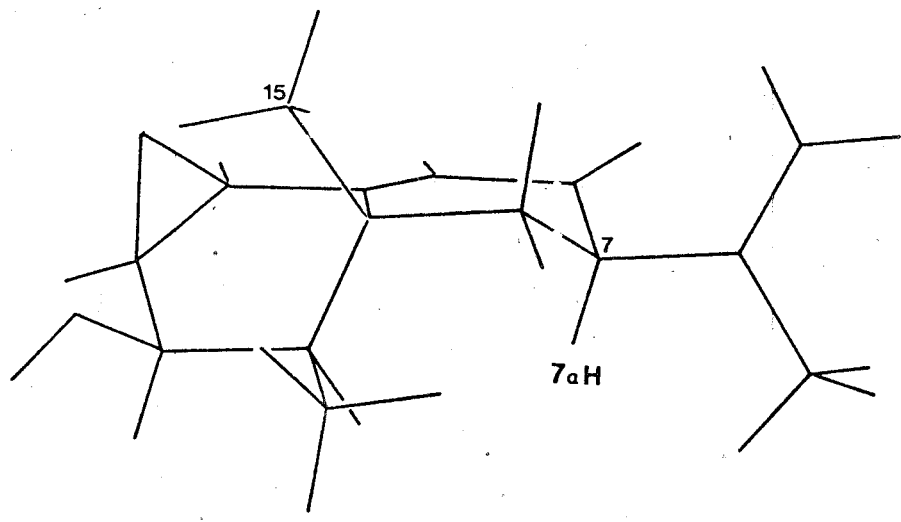
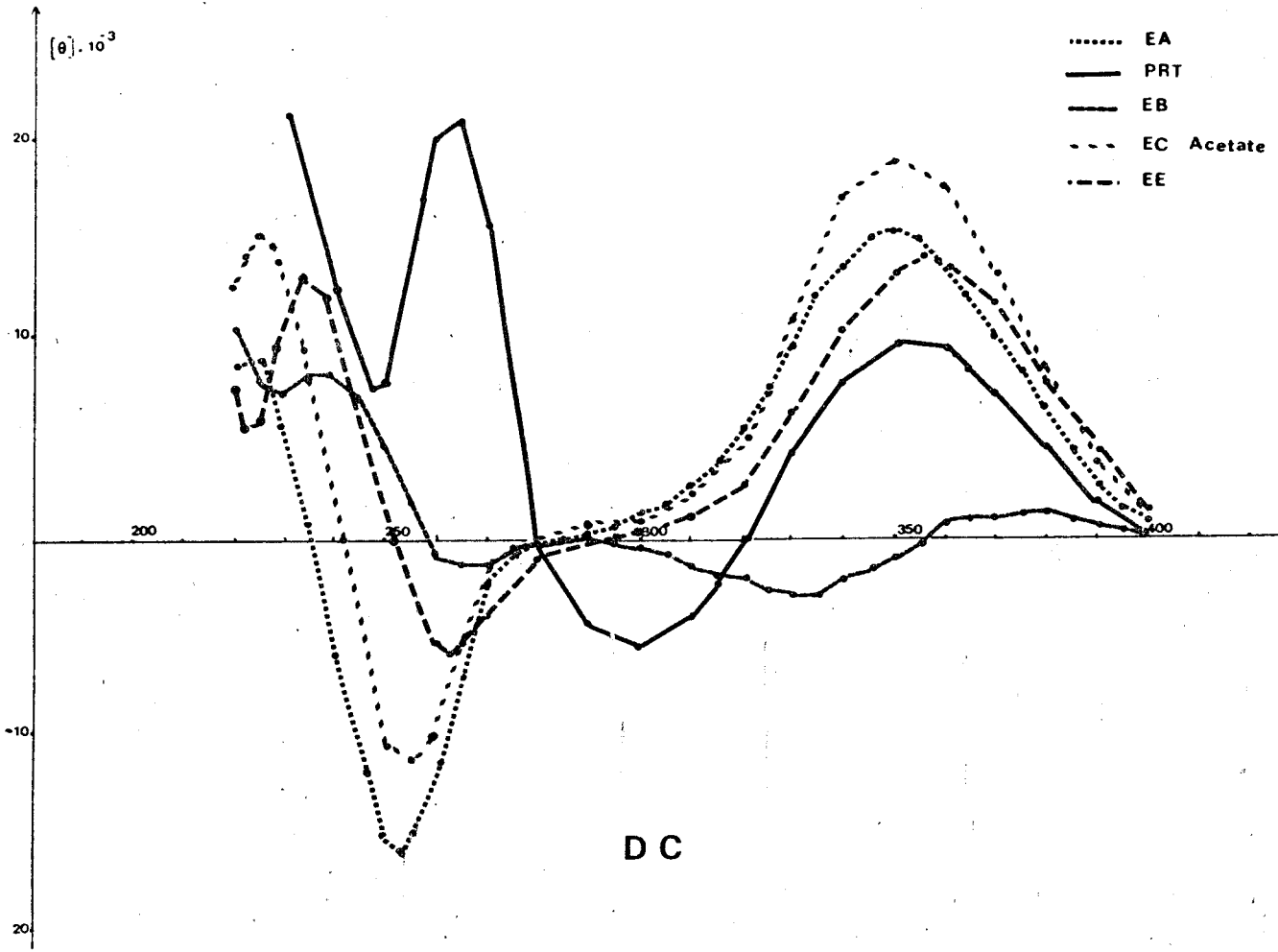
La configuration de la chaîne en 7 est soit α soit β ... (27).

La présence de la fonction époxyde C-7, C-11 de configuration β sur PRT, EA, EC, ED, EE ne permet pas de définir exactement si les sesquiterpènes de *P. roqueforti* appartiennent à la série 7α ou 7β .



Dispersion rotatoire





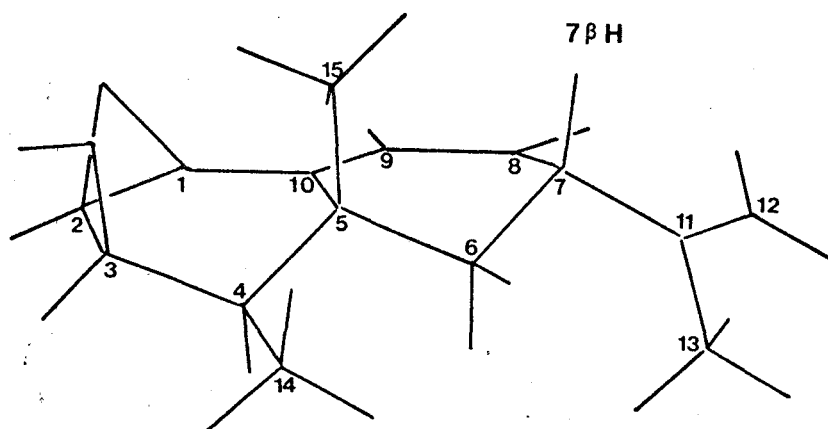
Parmi tous les composés élaborés par *P. roqueforti*, il est très probable que EB soit un précurseur des autres ou que tout au moins un squelette possédant la configuration de EB soit le précurseur des EA, PRT, EC, ED, EE (voir chapitre Biosynthèse).

Au cours de la biosynthèse des composés possédant l'époxyde en 7-11, l'introduction de cet époxyde se fait par une suite de réactions élémentaires pouvant modifier notablement la géométrie en 7 de départ. La stéréochimie de l'époxyde est donc le reflet de la stéréochimie de l'introduction de l'époxyde, mais non de la série métabolique.

Nous nous sommes donc attachés à déterminer la configuration du C-7 de EB.

La R.M.N. du proton indique que la chaîne en 7 est équatoriale. L'interprétation de la courbe de DC est trop délicate pour choisir entre une configuration ou l'autre à ce carbone.

L'examen des modèles de DREIDING montre que dans le cas d'une chaîne α ,



le proton en 7 est β axial. Ce proton se trouve alors en interaction 1,3 diaxiale avec le méthyle C-15. L'autre configuration ne montre bien sur aucune interaction de ce type.

Nous nous sommes orientés vers l'étude de cette interaction 1,3 diaxial par mesure de l'effet Overhauser.

Cet effet est une mesure de l'interaction de relaxation qui existe entre deux spins. Cette interaction se traduit par une perturbation de l'intensité du signal du spin observé, lorsque l'on fait résonner un spin voisin. On peut montrer que cet effet est inversement proportionnel à la distance des deux spins (31), et que dans le cas de deux spins identiques, il est égal au maximum à 50% (31).

Nous pouvons détecter l'interaction 1,3 diaxiale entre CH₃-15 et H-7 à l'aide de cet effet. Le spectre R.M.N. (200 MHz) de EB montre que les signaux H-7 et CH₃-15 sont bien distincts. On irradie en CH₃-15 et l'on observe le signal H-7. Le tableau suivant résume les mesures effectuées. Le rapport des intégrales des protons H-7/H-3 permet de déterminer l'augmentation d'intensité du proton H-7.

Mesure de l'effet Overhauser

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	<u>1,21</u>
δ 1,09 C-14	85,5	84,89	0,99
δ 0,5	86,6	82,56	0,95

L'irradiation en CH₃-15 provoque une augmentation de 20% du signal H-7. Par comparaison, l'irradiation en CH₃-14 ou CH₃-13 ou à δ = 0,5 ppm ne provoque aucune augmentation du signal observé.

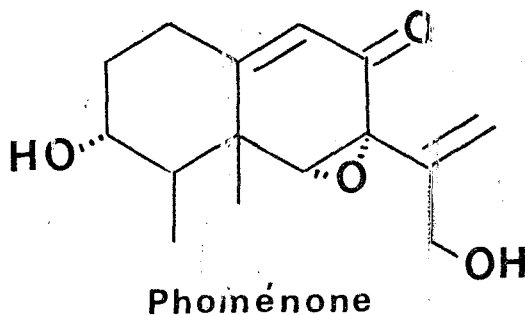
Le modèle moléculaire montre que dans le cas d'une configuration β du proton H-7, ce dernier proton peut être relaxé non seulement par le méthyle 15 mais également par le proton H-6 équatorial dont la distance H-6 - H-7 est pratiquement identique à CH₃-15 - H-7.

L'effet Overhauser observé (20%) est donc très net. Nous pouvons affirmer que le proton H-7 est en interaction 1,3 diaxiale avec CH₃-15, qu'il est donc de configuration β. La chaîne latérale isopropényle équatoriale est de configuration α.

Le squelette carboné précurseur des sesquiterpènes de *P. roqueforti* est un squelette éremophilane dont la configuration en 7 est inhabituelle 7_α.

Il est intéressant de noter que la configuration 7_α est généralement rencontrée dans les métabolites isolés de divisions inférieures du règne végétal (champignons, algues) (32 , 33). Les sesquiterpènes isolés des plantes supérieures étant généralement de la série 7_β (34). Les hépatiques qui sont situées phylogénétiquement entre les plantes vasculaires et les algues sont capables d'élaborer des sesquiterpènes des deux séries (35).

La phoménone isolée du champignon *Phoma exigua* (77) 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.



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.

Eremofortin D, a Valencane-Class Sesquiterpene

BY BERNADETTE ARNOUX AND CLAUDINE PASCARD

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France

AND SERGE MOREAU

Unité INSERM U 42, Domaine du Certia, 369 rue J. Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

(Received 31 April 1977; accepted 18 May 1977)

Abstract. $C_{17}H_{24}O_6$, monoclinic, $P2_1$, $a = 11.253$ (3), $b = 6.341$ (3), $c = 11.539$ (5) Å, $\beta = 93.0$ (2)°, $Z = 2$. The structure was solved by direct methods and refined to $R = 5.7\%$. The molecule is characterized by two *trans* ring junctions.

Introduction. A single crystal of eremofortin D, grown from ethyl acetate– CCl_4 , was mounted on a Philips PW 1100 automatic diffractometer. 1565 reflexions were measured with Cu $K\alpha$ radiation, monochromated with a graphite crystal. The structure was solved by *MULTAN* (Germain, Main & Woolfson, 1971). The E map corresponding to the best figure of merit gave all the heavy atoms. Refinement was carried out by full-matrix least squares using a modified version of *ORFLS* (Busing, Martin & Levy, 1962). The thermal parameters of the non-hydrogen atoms were anisotropic. All H atoms were introduced in the refinement procedure at their positions found in electron-density difference maps. Their thermal factors were kept isotropic at the values of the atoms to which they were bonded.

The scattering factors were those of Doyle & Turner (1968) for heavy atoms, and those of Stewart, Davidson & Simpson (1965) for H atoms.

The final R was 5.7%. Fractional coordinates for the heavy atoms are given in Table 1 and those for H in Table 2.*

* Lists of structure factors and anisotropic thermal parameters have been deposited with the British Library Lending Division as Supplementary Publication No. SUP 32710 (13 pp.). Copies may be obtained through The Executive Secretary, International Union of Crystallography, 13 White Friars, Chester CH1 1NZ, England.

Discussion. Eremofortin D has been isolated from a culture of *Penicillium roqueforti* as previously reported (Moreau, Gauderier, Lablache-Combiere & Biguet, 1976): m.p. 209–211°C, $[\alpha]_D^{20} = +91^\circ$ ($c = 1.17\%$, $CHCl_3$); $(\varphi)_{589} = +282^\circ$, $(\varphi)_{578} = +295^\circ$, $(\varphi)_{546} = +334^\circ$, $(\varphi)_{436} = +570^\circ$, $(\varphi)_{365} = +891^\circ$; $M_r = 324.35$.

Table 1. Fractional coordinates ($\times 10^4$) for the heavy atoms

The e.s.d.'s are given in parentheses.

	x	y	z
C(1)	6119 (3)	13608 (7)	816 (3)
C(2)	5168 (3)	14545 (7)	1471 (3)
C(3)	5160 (3)	14339 (7)	2767 (3)
C(4)	6333 (3)	13500 (6)	3333 (3)
C(5)	6884 (3)	11646 (6)	2657 (3)
C(6)	8108 (3)	11042 (6)	3266 (3)
C(7)	8738 (3)	9553 (7)	2523 (3)
C(8)	8920 (3)	10257 (6)	1287 (3)
C(9)	7754 (3)	10869 (7)	662 (3)
C(10)	7154 (3)	12501 (7)	1437 (3)
C(11)	9621 (3)	7874 (7)	2766 (3)
C(12)	10246 (4)	7532 (8)	1670 (4)
C(13)	10189 (4)	7274 (9)	3913 (3)
C(14)	6188 (3)	13089 (7)	4633 (3)
C(15)	6076 (3)	9698 (6)	2624 (3)
C(16)	3088 (3)	13750 (8)	2954 (4)
C(17)	2197 (4)	12127 (11)	3299 (5)
O(1)	4952 (2)	12619 (6)	804 (3)
O(2)	8373 (2)	7342 (5)	2556 (3)
O(3)	9718 (2)	11993 (0)	1415 (2)
O(4)	9502 (2)	8528 (5)	761 (2)
O(5)	4192 (2)	12966 (5)	3080 (3)
O(6)	2864 (3)	15496 (7)	2627 (4)

Composition: C 62.95, H 7.46% (calculated for $C_{17}H_{24}O_6$: C 62.95, H 7.46%).

Fig. 1, which shows the ORTEP (Johnson, 1965) drawing of the molecule as obtained from our X-ray

results, confirms fully the proposed formula. Tables 3 and 4 give the bond distances between heavy atoms and their valency angles.

As shown in Fig. 2, the molecule is characterized by two *trans* ring junctions. The C(14) and C(15) methyl groups are mutually *cis*. With respect to these methyl groups, the C(7)–C(11) epoxide is *syn*. This configuration is characteristic of the valencane class of sesquiterpenes (Overton & Roberts, 1971).

Studies on the toxicity of PR toxin and related compounds (Moreau, Gaudemer, Lablache-Combiér & Biguet, 1976; Moreau, Moulé & Bousquet, 1976) revealed the importance of the functional groups at C(7), C(8), C(11) and C(12). A knowledge of the stereochemistry of the sesquiterpenes produced by *P. roqueforti* is thus necessary in order to be able to draw conclusions on the relationships which may exist between chemical structure and biological activity.

Table 2. Fractional coordinates ($\times 10^3$) for the hydrogen atoms

	x	y	z
H(1)	632	1439	4
H(2)	486	1550	111
H(3)	509	1613	299
H(4)	692	1475	328
H(6A)	795	1051	401
H(6B)	860	1227	340
H(9A)	793	1152	-6
H(9B)	723	938	59
H(10)	775	1352	156
H(12A)	1038	598	151
H(12B)	1107	808	165
H(13A)	970	758	453
H(13B)	1028	569	406
H(13C)	1104	759	393
H(15A)	637	870	220
H(15B)	584	942	341
H(15C)	547	987	243
H(17A)	207	1260	427
H(17B)	247	1071	330
H(17C)	149	1247	291
H(O3)	1004	1234	71

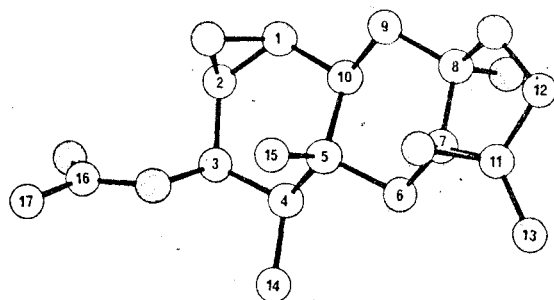


Fig. 1. An ORTEP drawing of the molecule.

Table 3. Intramolecular bond distances (Å)

The e.s.d.'s in parentheses refer to the last digit.

C(1)–C(2)	1.467 (5)	C(7)–C(11)	1.473 (6)
C(1)–C(10)	1.510 (5)	C(7)–O(2)	1.462 (5)
C(1)–O(1)	1.455 (5)	C(8)–C(9)	1.514 (5)
C(2)–C(3)	1.502 (5)	C(8)–O(3)	1.423 (4)
C(2)–O(1)	1.457 (6)	C(8)–O(4)	1.428 (5)
C(3)–C(4)	1.536 (5)	C(9)–C(10)	1.545 (5)
C(3)–O(5)	1.454 (5)	C(11)–C(12)	1.494 (6)
C(4)–C(5)	1.558 (5)	C(11)–C(13)	1.489 (6)
C(4)–C(14)	1.540 (5)	C(11)–O(2)	1.452 (5)
C(5)–C(6)	1.561 (5)	C(12)–O(4)	1.452 (5)
C(5)–C(10)	1.553 (5)	C(16)–C(17)	1.505 (7)
C(5)–C(15)	1.533 (5)	C(16)–O(5)	1.339 (5)
C(6)–C(7)	1.481 (5)	C(16)–O(6)	1.192 (7)
C(7)–C(8)	1.519 (5)		

Table 4. Intramolecular bond angles ($^\circ$)

The e.s.d.'s in parentheses refer to the last digit.

C(2)–C(1)–C(10)	120.7 (3)	C(7)–C(8)–C(9)	111.5 (3)
C(2)–C(1)–O(1)	59.8 (3)	C(7)–C(8)–O(3)	104.1 (3)
C(10)–C(1)–O(1)	118.6 (3)	C(7)–C(8)–O(4)	105.1 (3)
C(1)–C(2)–C(3)	121.3 (4)	C(9)–C(8)–O(3)	112.2 (3)
C(1)–C(2)–O(1)	59.7 (3)	C(9)–C(8)–O(4)	113.6 (3)
C(3)–C(2)–O(1)	116.3 (3)	O(3)–C(8)–O(4)	109.7 (3)
C(2)–C(3)–C(4)	113.8 (3)	C(8)–C(9)–C(10)	106.8 (3)
C(2)–C(3)–O(5)	110.1 (3)	C(1)–C(10)–C(5)	114.1 (3)
C(4)–C(3)–O(5)	109.0 (3)	C(1)–C(10)–C(9)	112.7 (3)
C(3)–C(4)–C(5)	113.8 (3)	C(5)–C(10)–C(9)	113.8 (3)
C(3)–C(4)–C(14)	109.9 (3)	C(7)–C(11)–C(12)	106.6 (3)
C(5)–C(4)–C(14)	115.1 (3)	C(7)–C(11)–C(13)	127.4 (4)
C(4)–C(5)–C(6)	109.0 (3)	C(7)–C(11)–O(2)	60.0 (2)
C(4)–C(5)–C(10)	107.0 (3)	C(12)–C(11)–C(13)	121.1 (4)
C(4)–C(5)–C(15)	111.7 (3)	C(12)–C(11)–O(2)	108.6 (3)
C(6)–C(5)–C(10)	106.4 (3)	C(13)–C(11)–O(2)	117.1 (3)
C(6)–C(5)–C(15)	108.8 (3)	C(11)–C(12)–O(4)	105.6 (3)
C(10)–C(5)–C(15)	113.8 (3)	C(17)–C(16)–O(5)	110.2 (4)
C(5)–C(6)–C(7)	109.5 (3)	C(17)–C(16)–O(6)	125.9 (4)
C(6)–C(7)–C(8)	116.7 (3)	O(5)–C(16)–O(6)	123.9 (4)
C(6)–C(7)–C(11)	133.5 (3)	C(1)–O(1)–C(2)	60.5 (3)
C(6)–C(7)–O(2)	116.9 (3)	C(7)–O(2)–C(11)	60.7 (3)
C(8)–C(7)–C(11)	105.6 (3)	C(8)–O(4)–C(12)	106.7 (3)
C(8)–C(7)–O(2)	111.0 (3)	C(3)–O(5)–C(16)	117.0 (3)
C(11)–C(7)–O(2)	59.3 (2)		

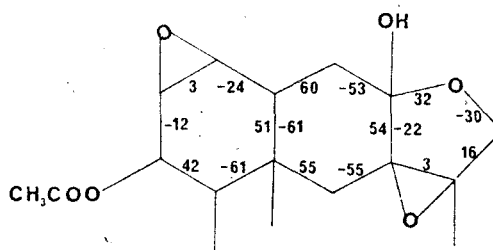


Fig. 2. Torsion angles ($^\circ$) for eremofortin D.

References

- BUSING, W. R., MARTIN, K. O. & LEVY, H. A. (1962). *ORFLS*. Report ORNL-TM-305. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee.
- DOYLE, P. A. & TURNER, P. S. (1968). *Acta Cryst.* **A24**, 390-397.
- GERMAIN, G., MAIN, P. & WOOLFSON, M. M. (1971). *Acta Cryst.* **A27**, 368-376.
- JOHNSON, C. K. (1965). *ORTEP*. Report ORNL-3794. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee.
- MOREAU, S., GAUDEMER, A., LABLACHE-COMBIER, A. & BIGUET, J. (1976). *Tetrahedron Lett.* p. 833.
- MOREAU, S., MOULÉ, Y. & BOUSQUET, J. F. (1976). 3rd International IUPAC Sponsored Symposium on Mycotoxins in Foodstuffs, Sept. 16-18.
- OVERTON, K. H. & ROBERTS, J. S. (1971). *Terpenoids and Steroids*, Special Periodical Reports, No. 1, p. 101. London: The Chemical Society.
- STEWART, R. F., DAVIDSON, E. R. & SIMPSON, W. T. (1965). *J. Chem. Phys.* **42**, 3175-3187.

THE CRYSTAL STRUCTURE AND ABSOLUTE
CONFIGURATION OF THE PR TOXIN

by F. BAERT^{*}, M. FOULON, and G. ODOU

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
59650 Villeneuve d'Ascq - France.

and

S. MOREAU

I.N.S.E.R.M. U. 42. 369, rue Jules Guesde 59650 Villeneuve d'Ascq
and laboratoire de Chimie organique Physique
Université des Sciences et Techniques de Lille I
59650 Villeneuve d'Ascq - France.

$C_{17}O_6H_{20}$ is orthorhombic, space group $P2_12_12_1$ with $a = 13.999$ (11),
 $b = 12.360$ (12), $c = 9.664$ (09), $z = 4$. The structure was determined
from 2622 independent intensities and refined to $R = 0.046$. The absolute
configuration was solved by the Bijvoet method and corresponds to that
predicted on chemical bases. The crystal structure is stabilized only
by Van der Waals forces.

INTRODUCTION

PR Toxin has been isolated from cultures of *PENICILLIUM Roque Forti* (WEI, SCHNOES, HART & STRONG, 1975). The biological properties result particularly in the inhibition of protein and RNA syntheses (MOULE, JEMMALI & ROUSSEAU, 1976). A study of the relationships between the chemical structure and the biological properties allowed to point out the important role of an aldehyde group in position 12 associated with an epoxyde group and an α , β unsaturated ketone (MOULE, MOREAU & BOUSQUET, 1977). In order to approach the mechanism of action, it was important to determine the absolute configuration. It must be emphasize that the octant rule of circular dichroism on ketone can't be used in such a complicated case. The impossibility to obtain a well crystallized Br derivative led us to attempt the determination of the absolute configuration by using anomalous diffraction of the oxygen atom.

EXPERIMENTAL

A well shaped crystal of 0.30 x 0.24 x 0.21 mm was mounted on a Philips diffractometer. The crystallographic data are reported in Table 1. Intensities for 2622 reflections were measured by ω - 2θ scan on a four circle diffractometer. The width of the scan was 1.2° . The Data were corrected for the Lorentz and polarisation factor, but not for absorption or extinction.

1284 reflections with $I \geq 3\sigma(I)$ were considered in the determination of the structure.

STRUCTURE DETERMINATION AND REFINEMENT

The structure was solved by direct methods, 250 reflexions with normalized structure factors $|E| \geq 1.55$ were used in the MULTAN program (GERMAIN, MAIN, WOOLFSON, 1971). A Fourier synthesis based on the solution with the best figure of merit revealed a great part of the molecule (18 upon 23 non hydrogen atoms). One subsequent Fourier map led to the identification of all the 23 atoms of the molecule. This model was refined by full-matrix least-squares methods, H atoms were located from difference maps except two H of the methyl group in 17 which were fitted at their expected positions. In the final stages the positionnal parameters and the isotropic temperature factors of the H atoms were allowed to vary. This procedure led to the values :

$$R = 0.046 \quad R = \frac{\sum |F_o| - |F_c|}{\sum |F_o|}$$

$$WR = 0.042 \quad WR = \frac{\sum \omega (|F_o| - |F_c|)^2}{\sum \omega |F_o|^2}$$

with the unit weighting scheme. The goodness of fit defined by

$$\frac{\sum \omega (|F_o| - |F_c|)^2}{N_o - N_v} \quad \text{is } 4.63.$$

N_o = number of observations

N_v = number of parameters.

During the final stages the unit weights were replaced by weights $w = 1/\sigma^2$ derived from counter statistics plus a term taking account a

part of the systematic errors $\sigma^2(I) = \sigma^2(I)_{\text{counting}} + (CI)^2$ where C was estimated to 0.01.

The values of the R, WR, and goodness of fit are respectively 0.043, 0.049, 2.14.

The final atomic parameters are listed in Table 2. The scattering factors for the heavy atoms were those of Hanson, Herman, Lea & Skillman (1964), for H those of Stewart, Davidson & Simpson (1965). Peaks and troughs in the final difference synthesis did not exceed $\pm 0.2 \text{ \AA}^{-3}$.

DETERMINATION OF THE ABSOLUTE CONFIGURATION

The determination of the absolute configuration was based on the oxygen atoms, and was determined by the BIJVOET method. Theoretical estimates of the Bijvoet ratio $[\Delta I/I = (I_{hkl} - I_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}})/0.5 (I_{hkl} + I_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}})]$ were calculated from the final coordinates given in Table 2 with the $\Delta f'$ and $\Delta f''$ values of C and O. Since the anomalous dispersion effect was expected to be very small, eighteen reflections with calculated ratios ≥ 0.02 were selected from the data. Measurements were made by a procedure which compensates for any short-term instability of the instrument : I_{hkl} and then $I_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$ were measured successively for each reflection eight times with $\lambda(\text{CuK}\alpha) = 1.5418 \text{ \AA}$. The $\omega.2\theta$ scan technique was used with a scan range of 1° and a scan speed of $0.003^\circ \text{ sec}^{-1}$. The background was measured on either side of the peak for 84 s. The Bijvoet ratios were obtained only from I_{hkl} and $I_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$, to avoid absorption effects which likely would hamper the measurements.

The intensities of each group of observations of the same chirality were averaged to yield 18 BIJVOET pairs. Table 3 lists the measured and calculated values. Comparison of the signs (except two indicated by an asterisk) shows that the absolute configuration is the same as that

used for the calculated values, whose coordinates are listed in Table 2. The absolute configuration corresponds to that predicted on chemical and correlative bases. Moreover the absolute configuration corresponds to the eremophilane type. Such a configuration has already been found for a fungi metabolite of this type (RICHE, PASCARD-BILLY, DEVYS, GAUDEMER, BARBIER & BOUSQUET),

Fig. 1 shows the shapes and orientations of the thermal vibration ellipsoids.

THERMAL VIBRATION ANALYSIS

The vibrational motions were analysed in terms of the rigid body tensors T , L and S (SCHOMAKER & TRUEBLOOD, 1968). The elements of the tensors T , L and S given in Table 4 are derived from a least squares fit of the atomic B_{ij} 's. The root mean square differences between the observed U_{ij} and those calculated from T , L and S is 0.0080 \AA^2 .

This rather high value is specially due to the atoms O(1), O(6), C(9), C(16), C(13) whose $\Delta u^{ij} = (U_o^{ij} - U_c^{ij})$ are between 0.0015 and 0.0436 \AA^2 .

The translation are almost isotropic with an average amplitude of 0.18 \AA . The off-diagonal elements of the libration tensor L referred to the inertial axes of the molecules are of the same rate, Table 5, as those related to orthogonal axes, so it can be assumed that the molecules does not librate around their inertial axes. However the angles between the eigen vectors of the tensor L and the inertial axes are not too large ($5^\circ 67$, $7^\circ 52$, $15^\circ 39$ respectively).

The largest amplitude of vibration is around the axe with the smallest moment of inertia.

The amplitudes of libration were used to correct the effects of molecular vibration on the bond lengths (BUSING & LEVY, 1964), the values reported

in Table 6 are in better agreement with the standard ones.

RESULTS AND DISCUSSION

- Molecular Geometry

the bond lengths both uncorrected and corrected for the effects of molecular libration (BUSING & LEVY, 1964) and bond angles for the molecules are reported in Table 6.

The bond lengths are close to the expected value except for the two $C_{sp^3} - C_{sp^3}$ type adjacent to the epoxide ring, which are 1.500 for C(3) - C(4) and 1.503 for C(7) - C(6). This shortness is linked to the special hybridization of the C atoms in the presence of epoxyde group. The extremely short C(1) - C(2) 1.470 and C(7) - C(11) 1.487 bonds which are engaged in the epoxide ring are in good agreement with those exposed by (BRISSE, JUST & BLANK, 1978). The angles of the epoxide rings are all close to 60° and the average value of the C - C - O and C - O - C angles, respectively $59^\circ 4'$ and $61^\circ 3'$ compares well with $59^\circ 2'$ and $61^\circ 4'$, the values reported by BRISSE et al.

The planes passing through atoms {C(3), C(2), C(1), C(10)} = P1, {C(10), C(9), C(8), C(7)} = P2 and the deviations of atoms from those planes are listed in Table 7.

As can be seen from their equations these planes are nearly parallel to the (ab) plane. The plane of the 1 β , 2 β , epoxide ring makes an angle of $103^\circ 4'$ with the plane P1. The angle between the planes P1 and P2 is $16^\circ 90'$. The ring torsion angles are shown in Fig. 2. The epoxide group on C(1), C(2), the acetate group on C(3) and the methyl group on C(5) are mutually syn. This fact could explain the bad yield obtained during the esterification of 3 β , OH by p. Bromobenzoylchloride in order to synthesize a Bromo derivative of PR Toxin.

- Molecular packing

Fig. 3 illustrates the packing of the molecules in the plane (011). As shown in Table 8 no intermolecular distances are less than the sum of the Van der Waals radii of the atoms involved, except the value between the atoms C(9) and C(15).

The packing of the molecules can be described in terms of layers almost parallel to the (ab) plane. (see equation of the mean plane of the rings). As we have reported on Fig. 3 and Table 8 each molecule is bonded by Van der Waals forces, with six neighbours molecules belonging to other layers.

This work was supported in part by C.N.R.S. (E.R.A. n° 465, Dynamique des cristaux moléculaires) and by I.N.S.E.R.M. (U 42).

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1 : A general view of the configuration of the molecule showing the crystallographic numbering scheme.
- Fig. 2 : Ring torsion angles. The e.s.d'.s for the torsion angles are of the order of 3°.
- Fig. 3 : Projection along a of the structure of PR Toxin. The shortest distances have been reported between molecules.

TABLE 1. : Crystal data

$C_{17} O_6 H_{20}$, orthorombic P_{212121}

F.W. 320.27

\underline{a} = 13.999 (11)

\underline{b} = 12.360 (12)

\underline{c} = 9.664 (9)

v = 1672.1 \AA^3 , z = 4

D_x = 1.27 g cm^3

λ (MoK α) = 0.7107

μ (MoK α) = 1.03 cm^{-1}

λ (CuK α) = 1.5418

μ (CuK α) = 8.12 cm^{-1}

$F(000)$ = 680

Room temperature 21 (\pm 2 $^\circ$)



TABLE 2 : Atomic parameters

Fractional positional parameters are $\times 10^4$ for H $\times 10^3$. The temperature factor of the heavy atoms ($\times 10^5$) is $\tau = \exp [-(\beta_{11}h^2 + \beta_{22}k^2 + \beta_{33}l^2 + 2\beta_{12}hk + 2\beta_{13}hl + 2\beta_{23}kl)]$. H atoms have isotropic temperature factors.

O(5)	7135 (2)	6902 (2)	6594 (4)	527 (19)	465 (20)	1765 (54)	- 40 (17)	- 55 (29)	+ 17 (31)
O(4)	5963 (2)	8570 (2)	7528 (4)	533 (19)	699 (26)	1920 (58)	- 16 (20)	282 (31)	+ 78 (37)
O(3)	9624 (2)	13657 (3)	5209 (4)	882 (29)	890 (35)	2659 (85)	- 239 (27)	53 (43)	+ 373 (50)
O(2)	9256 (2)	11396 (2)	7462 (3)	597 (19)	724 (26)	1204 (44)	- 18 (20)	- 181 (28)	- 41 (32)
C(9)	6378 (2)	11087 (3)	6404 (4)	384 (23)	570 (32)	967 (59)	+ 98 (24)	- 29 (34)	+ 18 (39)
C(3)	6312 (3)	7684 (3)	5578 (4)	487 (26)	575 (33)	1423 (72)	- 71 (26)	- 124 (40)	- 204 (44)
O(1)	7652 (2)	12754 (2)	6484 (4)	634 (22)	527 (25)	3051 (82)	+ 17 (20)	191 (41)	- 81 (43)
C(4)	7647 (3)	8424 (3)	5212 (4)	439 (24)	502 (29)	1018 (60)	+ 34 (22)	- 63 (33)	- 13 (37)
C(8)	7713 (3)	11779 (3)	6369 (4)	487 (27)	541 (33)	1209 (68)	+ 28 (24)	- 29 (40)	+ 18 (42)
C(10)	6914 (2)	10011 (3)	6394 (4)	325 (22)	563 (30)	803 (52)	+ 33 (21)	- 19 (31)	- 32 (38)
C(7)	8665 (2)	11217 (3)	6235 (4)	400 (21)	544 (32)	987 (58)	- 53 (23)	- 41 (35)	+ 48 (38)

TABLE 2 : (continued, page 2)

C(1)	5998 (3)	9414 (3)	6484 (5)	359 (23)	648 (35)	1753 (82)	+ 9 (25)	16 (39)	+ 10 (52)
C(5)	7840 (2)	9371 (3)	6245 (4)	358 (22)	442 (26)	780 (53)	+ 21 (20)	- 19 (30)	0 (34)
C(11)	9536 (3)	11899 (3)	6158 (4)	437 (25)	653 (36)	1196 (70)	- 118 (25)	- 62 (37)	- 56 (42)
C(13)	10433 (3)	11502 (4)	5471 (6)	433 (27)	888 (43)	2400(106)	- 153 (30)	96 (48)	- 331 (65)
C(12)	9439 (3)	13117 (4)	6208 (5)	496 (28)	711 (40)	1948 (94)	- 183 (29)	- 110 (48)	- 7 (55)
C(15)	8167 (3)	8968 (3)	7688 (4)	446 (24)	662 (32)	950 (60)	+ 9 (25)	- 122 (35)	+ 111 (40)
C(6)	8621 (3)	10104 (3)	5621 (4)	387 (23)	575 (32)	907 (52)	0 (23)	0 (32)	- 50 (38)
C(16)	6565 (3)	6034 (3)	6791 (6)	713 (36)	493 (35)	2543(117)	- 22 (32)	165 (57)	- 131 (57)
C(2)	5947 (3)	8269 (3)	6093 (5)	355 (24)	603 (38)	2219(101)	- 123 (24)	- 188 (44)	+ 80 (50)
C(14)	8542 (3)	7762 (3)	4856 (5)	589 (30)	625 (36)	1413 (74)	+ 74 (28)	112 (42)	- 156 (47)
O(6)	5832 (3)	5916 (3)	6195 (5)	849 (29)	719 (31)	4340(123)	- 301 (27)	- 433 (56)	- 1 (54)
C(17)	6968 (4)	5287 (4)	7857 (7)	931 (45)	668 (42)	3426(148)	+ 16 (37)	240 (74)	+ 584 (69)



TABLE 2 (continued, page 3)

H(C9)	633 (3)	1141 (3)	642 (4)	3.5 (8)	H"(C14)	907 (3)	822 (3)	442 (5)	5.4 (10)
H(C13)	1041 (3)	1081 (4)	562 (5)	7.6 (11)	H(C3)	666 (3)	725 (3)	474 (5)	3.9 (10)
H'(C13)	1094 (3)	1179 (4)	593 (5)	6.2 (12)	H(C2)	532 (3)	798 (3)	572 (5)	4.1 (10)
H"(C13)	1032 (3)	1161 (4)	453 (5)	10.2 (12)	H(C1)	538 (3)	982 (4)	645 (5)	4.0 (10)
H(C5)	772 (3)	854 (3)	810 (5)	4.7 (10)	H(C6)	929 (3)	971 (3)	576 (4)	2.9 (9)
H'(C5)	879 (3)	851 (4)	754 (5)	5.9 (10)	H'(C6)	844 (3)	1020 (3)	459 (4)	2.7 (8)
H"(C5)	843 (3)	959 (3)	826 (5)	5.5 (10)	H(C17)	656 (3)	518 (4)	861 (5)	15.9 (12)
H(C4)	748 (3)	878 (3)	433 (5)	3.0 (10)	H'(C17)	705 (3)	461 (4)	736 (5)	14.9 (12)
H(C14)	838 (3)	719 (4)	414 (5)	6.8 (10)	H"(C17)	755 (3)	544 (4)	817 (5)	9.6 (12)
H'(C14)	877 (3)	741 (4)	566 (5)	4.1 (10)	H(C12)	931 (3)	1339 (4)	728 (4)	6.8 (10)

TABLE 3 : Comparaison of observed and calculated Bijvoet ratios.

h k l	$100 [\Delta I/I]_{\text{cal}}$	$100 [\Delta I/I]_{\text{obs}}$
10 3 1	- 2.3	- 0.7
16 3 1	- 2.4	- 7
12 6 1	+ 3.6	+ 2.6
7 8 1	- 3.3	- 8.6
11 2 2	+ 2.3	+ 3.0
6 3 2	+ 3.8	+ 6.2
6 5 2	- 4.3	- 0.2
5 6 2	+ 2.0	+ 2.6
10 2 3	- 2.6	- 1.6
8 2 3	+ 2.2	+ 1.0
11 7 3	- 2.0	- 7.8
2 2 4	- 5.8	- 2.4
7 4 4	- 2.0	+ 0.5 [*]
7 1 5	- 4.3	- 2.7
12 3 5	- 2.2	- 7.3
12 6 6	+ 2.0	+ 0.2
5 1 8	+ 2.1	- 6.4 [*]
1 2 8	- 2.0	- 8.0



TABLE 4 : Rigid body vibration parameters for the heavy atoms of the molecule with their e.s.d'.s.

T (\AA^2)	326 (24)	33 (19)	- 47 (24)
$\times 10^{-4}$		393 (19)	- 17 (20)
			299 (31)
L (rad^2)	47 (3)	16 (2)	- 4 (2)
$\times 10^{-4}$		76 (8)	- 6 (3)
			19 (2)
S (\AA rad)	- 30 (72)	38 (67)	51 (41)
$\times 10^{-5}$	22 (90)	50 (111)	390 (65)
	27 (30)	40 (39)	59 (861)
r.m.s. (u^o-u^c)	0.0080		
(\AA^2)			
e.s.d. u_{ij}^{obs}	0.0086		
(\AA^2)			

TABLE 5 : T and L referred to the inertial axes of the molecule.

Principal axes (Å)	T(Å ²) x 10 ⁻⁴			Principal axes (°)	L(rad ²) x 10 ⁻⁴			Inertial moments	Direction cosines		
	x	y	z		x	y	z				
0.18	326	33	-46	3.92	40	-2	10	1662	0.874	-0.460	-0.154
0.20		393	-16	4.97		83	13	305	0.457	0.886	-0.064
0.16			300	2.49			21	1820	0.168	-0.014	-0.985
0.20	409	-1	79	5.22		-2	13	305	0.457	0.886	-0.064
0.18		323	126	3.63		40	10	1662	0.874	-0.460	-0.154
0.16			315	2.40			21	1820	0.168	-0.014	-0.985



TABLE 6 : Bond lengths (\AA) before and after libration correction for the heavy atoms, and bond angles, with e.s.d'.s in parentheses.

	Uncorrected	Corrected
O(5) -C(3)	1.445 (5)	1.452
O(5) -C(16)	1.349 (5)	1.353
O(4) -C(1)	1.447 (5)	1.453
O(4) -C(2)	1.429 (6)	1.437
O(3) -C(12)	1.196 (6)	1.202
O(2) -C(7)	1.456 (5)	1.465
O(2) -C(11)	1.452 (5)	1.460
C(9) -C(8)	1.446 (5)	1.451
C(9) -C(10)	1.329 (5)	1.333
C(3) -C(4)	1.524 (6)	1.529
C(3) -C(2)	1.492 (6)	1.500
O(1) -C(8)	1.211 (5)	1.215
C(4) -C(5)	1.557 (5)	1.564
C(4) -C(14)	1.533 (6)	1.541
C(8) -C(7)	1.506 (5)	1.514
C(10)-C(1)	1.479 (5)	1.485
C(10)-C(5)	1.523 (4)	1.530
C(7) -C(11)	1.482 (5)	1.487
C(7) -C(6)	1.497 (5)	1.503
C(1) -C(2)	1.464 (5)	1.470
C(5) -C(15)	1.543 (5)	1.552
C(5) -C(6)	1.539 (5)	1.545
C(11)-C(13)	1.499 (6)	1.507
C(11)-C(12)	1.510 (6)	1.515
C(16)-O(6)	1.186 (6)	1.190
C(16)-C(17)	1.489 (8)	1.496

TABLE 6 : (Continued, page 2)

C (10) - C (1) - C (2)	120.5 (4)	C (7) - O (2) - C (11)	61.3 (2)
C (4) - C (5) - C (10)	107.6 (3)	C (8) - C (9) - C (10)	124.0 (3)
C (4) - C (5) - C (15)	112.5 (3)	O (5) - C (3) - C (4)	108.5 (3)
C (4) - C (5) - C (6)	108.4 (3)	O (5) - C (3) - C (2)	110.7 (3)
C (10) - C (5) - C (15)	109.6 (3)	C (4) - C (3) - C (2)	114.0 (3)
C (10) - C (5) - C (6)	109.6 (3)	C (3) - C (4) - C (5)	115.8 (3)
C (15) - C (5) - C (6)	109.3 (3)	C (3) - C (4) - C (14)	110.9 (3)
O (2) - C (11) - C (7)	59.5 (2)	C (5) - C (4) - C (14)	113.7 (3)
O (2) - C (11) - C (13)	117.8 (3)	C (9) - C (8) - O (1)	121.9 (4)
O (2) - C (11) - C (12)	112.0 (3)	C (9) - C (8) - C (7)	116.3 (3)
C (7) - C (11) - C (13)	121.6 (4)	O (1) - C (8) - C (7)	121.8 (3)
C (7) - C (11) - C (12)	119.3 (3)	C (9) - C (10) - C (1)	117.7 (3)
C (13) - C (11) - C (12)	114.5 (4)	C (9) - C (10) - C (5)	123.4 (3)
O (3) - C (12) - C (11)	120.6 (4)	C (1) - C (10) - C (5)	118.9 (3)
C (7) - C (6) - C (5)	114.5 (3)	O (2) - C (7) - C (8)	111.3 (3)
O (5) - C (16) - O (6)	122.8 (4)	O (2) - C (7) - C (11)	59.2 (3)
O (5) - C (16) - C (17)	111.4 (4)	O (2) - C (7) - C (6)	118.8 (3)
O (2) - C (16) - C (17)	125.8 (5)	C (8) - C (7) - C (11)	118.0 (3)
O (4) - C (2) - C (3)	115.7 (3)	C (8) - C (7) - C (6)	114.8 (3)
O (4) - C (2) - C (1)	60.0 (3)	C (11) - C (7) - C (6)	122.4 (3)
C (3) - C (2) - C (1)	120.8 (4)	O (4) - C (1) - C (10)	115.4 (3)
C (3) - O (5) - C (16)	116.2 (3)	O (4) - C (1) - C (2)	58.8 (3)
C (1) - O (4) - C (2)	61.2 (3)		



TABLE 6 : (Continued, page 3)

C (9)-H (C9)	0.86	C (15)-H" (C15)	1.02
C (3)-H (C3)	0.99	C (6)-H (C6)	1.07
C (1)-H (C1)	1.00	C (6)-H' (C6)	1.02
C (4)-H (C4)	0.98	C (2)-H (C2)	1.00
C(13)-H (C13)	0.87	C(14)-H (C14)	1.01
C(13)-H' (C13)	0.92	C(14)-H' (C14)	0.94
C(13)-H" (C13)	0.92	C(14)-H" (C14)	1.03
C(12)-H (C12)	1.10	C(17)-H (C17)	0.92
C(15)-H (C15)	0.90	C(17)-H' (C17)	0.96
C(15)-H' (C15)	1.05	C(17)-H" (C17)	0.90

TABLE 7 : Mean Plane.

Equation for the least square plane :

$$P1 - 2215 x + 0.2665 y - 0.9380 z + 4.6366 = 0$$

$$P2 - 0.0700 x + 0.0217 y - 0.9973 z + 6.5601 = 0$$

Atom	Déviatiion from plane	Atom	Déviatiion from plane
C(3) [*]	- 0.0017	C(10) [*]	+ 0.0074
C(2) [*]	0.0035	C(9) [*]	- 0.0151
C(1) [*]	- 0.0035	C(8) [*]	+ 0.0140
C(10) [*]	+ 0.0017	C(7) [*]	- 0.0063
O(4)	+ 1.2092	C(5)	- 0.0375
O(5)	+ 1.2761	C(6)	- 0.5724
C(4)	- 0.3185	C(15)	+ 1.4055
C(5)	+ 0.3650	O(2)	+ 1.2286
C(14)	- 0.1455	O(1)	+ 0.0932
C(15)	+ 1.9071		

* Atoms included in the mean-plane calculation.



TABLE 8 : Shortest intermolecular distances between non hydrogen atoms.

O(4) -C(13)	2/011 [★]	3.439 (6)
C(9) -C(15)	2/010	3.572 (5)
C(9) -C(14)	2/011	3.656 (6)
C(10)-C(15)	2/010	3.779 (5)
C(1) -O(3)	3/010	3.465 (5)
C(11)-O(4)	2/010	3.605 (5)
C(13)-O(6)	3/000	3.433 (6)
C(12)-C(15)	4/010	3.663 (6)
C(6) -O(4)	2/010	3.442 (5)
C(2) -O(2)	2/010	3.525 (5)
C(14)-C(9)	2/010	3.656 (6)
C(17)-O(3)	2/011	3.430 (7)

★Equivalent position nomenclature : O(4) - C(13) 2/ is taken to mean atom O(4) at equivalent position 1 to atom C(13) at equivalent position 2, translated 0, 0, 1 unit cells in the a, b and c directions respectively
 $1 = x, y, z$; $2 = 1/2 - x, -y, 1/2 + z$; $3 = 1/2 + x, 1/2 - y, -z$;
 $4 = -x, 1/2 + y, 1/2 - z$.

REFERENCES

BRISSE, F., JUST, G., & BLANK, F.
(1978) Acta Cryst. B 34, 557-562.

BUSING, W.R. & LEVY, H.A.
(1964) Acta Cryst. 17, 142-146.

GERMAIN, G., MAIN, P. & WOOLFSON, M.M.
(1971) Acta Cryst. A 27, 368-376

HANSON, M.P., HERMAN, F., LEA, J.D. & SKILLMAN, S.
(1964) Acta Cryst. 17, 1040-1044.

MOULE, Y., JEMMALI, M. & ROUSSEAU, N.
(1976) Chem. biol. interactions 14, 207-216.

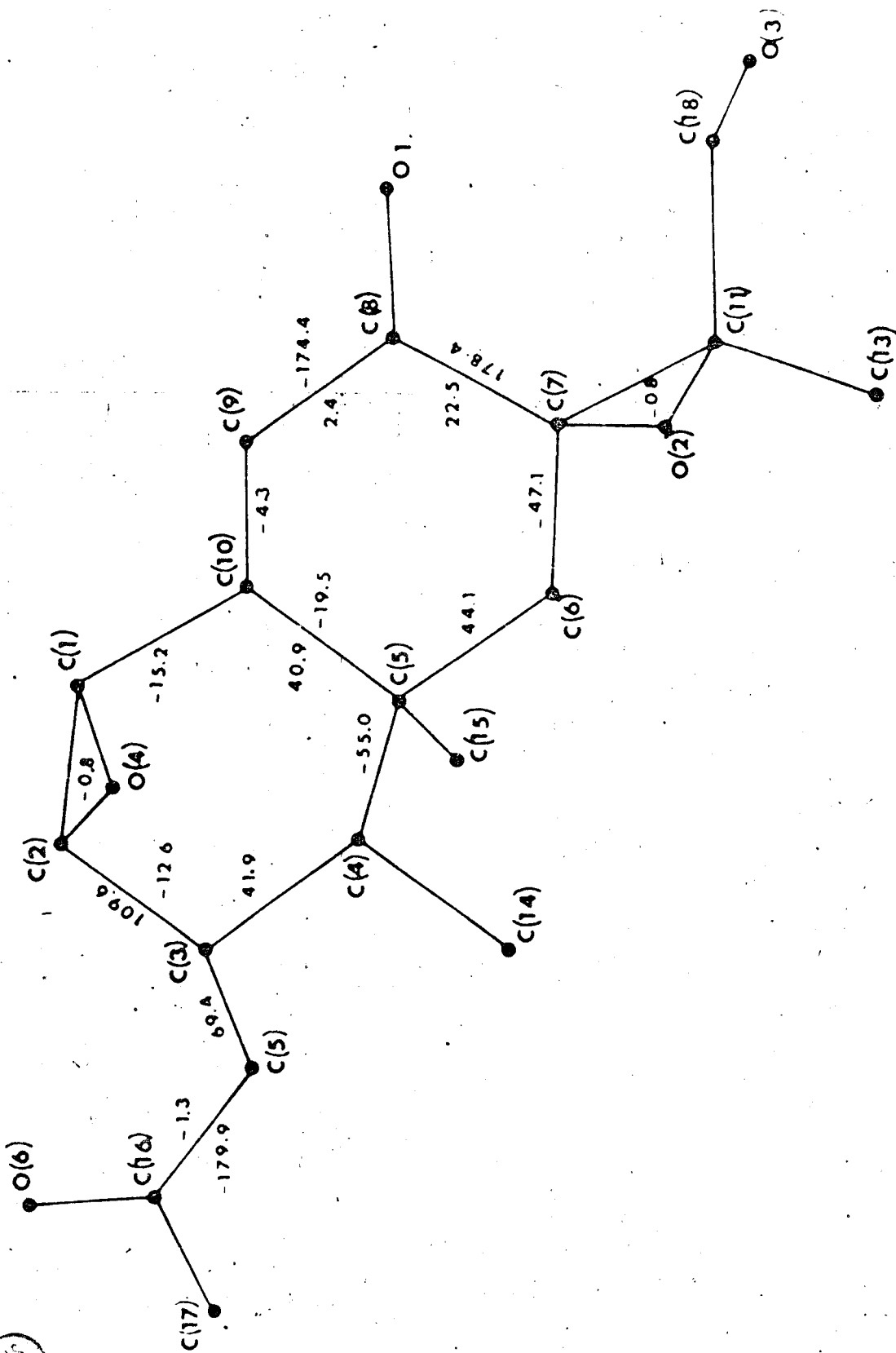
MOULE, Y., MOREAU, S. & BOUSQUET, J.F.
(1977) Chem. biol. interactions 17, 185-192.

RICHE, C., PASCARD-BILLY, C., DEVYS, M., GAUDEMER, A., BARBIER, M.,
& BOUSQUET, J.F.
(1974) Tetrahedron letters 32, 2765-2766.

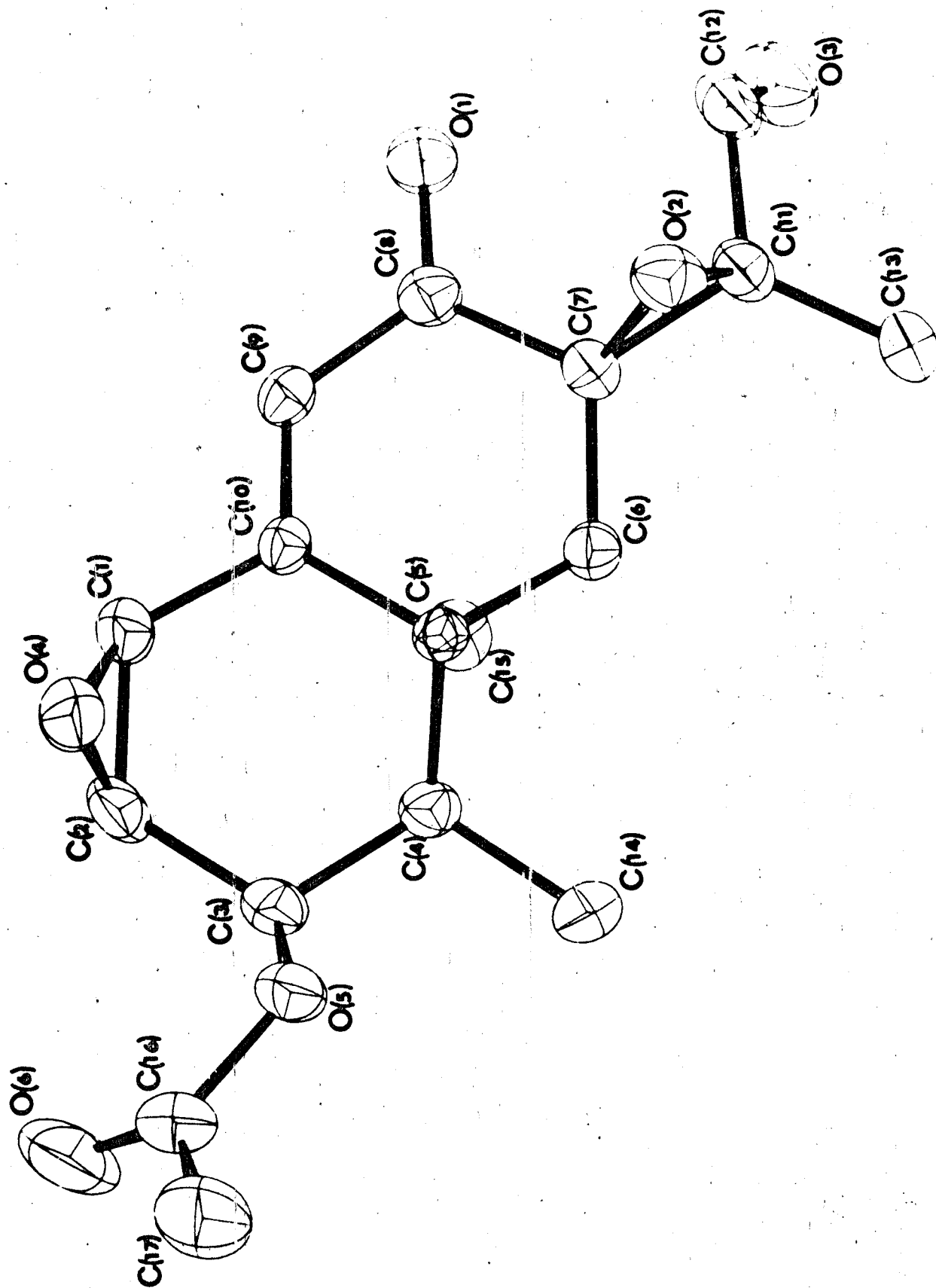
SCHOMAKER, V. & TRUEBLOOD, K.N.
(1968) Acta Cryst. B 24, 63-76.

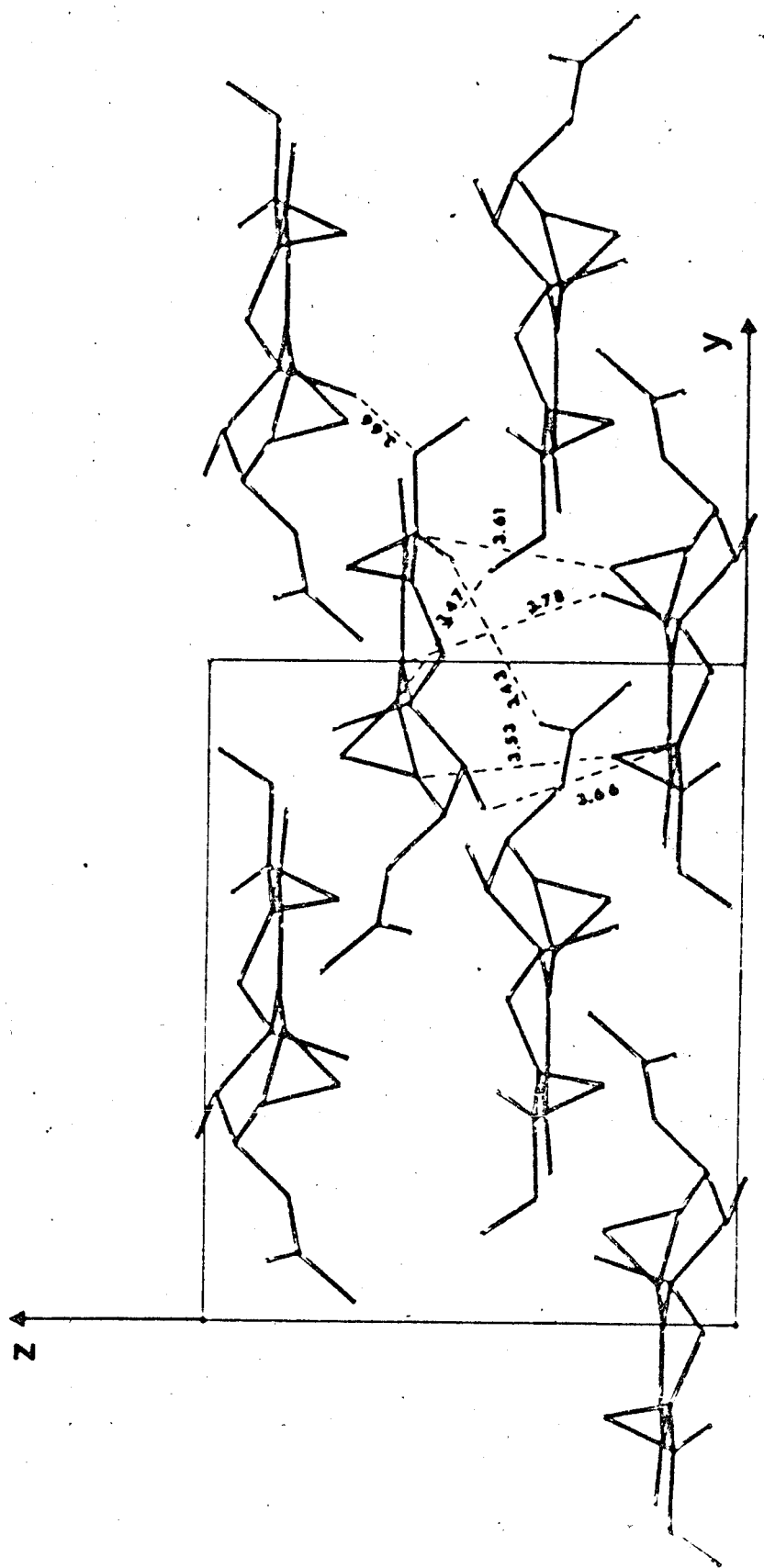
STEWART, R.F., DAVIDSON, E.R., & SIMPSON, W.T.
(1965) J. Chem. Phys. 42, 3175-3187.

WEI, R.D., SCHNOES, H.K., HART, P.A. & STRONG, F.H.
(1975) Tetrahedron 31, 109-114.



RIUS
SILIE





BIOSYNTHESES DES SESQUITERPENES

DE P. ROQUEFORTI

--0000000--

M É T A B O L I S M E S E C O N D A I R E

I - DEFINITION -

Le métabolisme primaire d'un organisme est constitué par l'ensemble des réactions chimiques catalysées par ces enzymes qui fournissent à cet organisme son énergie et ses constituants essentiels : protéines, acides aminés, acides nucléiques, lipides, phospholipides, polysaccharides. Ce métabolisme est essentiellement identique pour tous les êtres vivants.

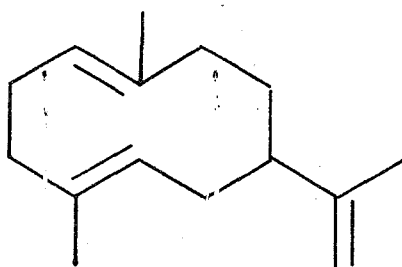
En dehors de ces produits du métabolisme primaire, les plantes et dans une moindre mesure le règne animal produisent une infinie variété de substances dont la présence est révélée par leur couleur, goût, odeur, ou leur action physiologique. Un grand nombre de ces substances fait partie de la "matière médicale", par exemples : alcaloïdes, antibiotiques, terpènes, hétérosides, etc...

Ces substances ne paraissent jouer en général aucun rôle dans la biologie de l'organisme qui les synthétise, elles sont couramment désignées sous le terme : métabolites secondaires. Les réactions qui engendrent ces métabolites sont regroupées sous le terme métabolisme secondaire.

Toutes les études réalisées à ce jour montrent que ces métabolismes primaires et secondaires sont très interdépendants. Une frontière ne peut pas être clairement définie entre ces deux domaines. Le métabolisme secondaire utilise des intermédiaires du métabolisme primaire. Certains métabolites secondaires, contrairement à la règle, ont un rôle biologique bénéfique pour l'organisme producteur.

Citons : Le rôle des pigments floraux est un phénomène bien connu. Ils attirent sélectivement certains insectes provoquant la pollination (36).

Citons encore : Les phéromones qui interviennent chez les insectes dans la communication entre individus d'une même espèce. Les phéromones sexuelles par exemple sont libérées par la femelle dans le double but d'attirer le mâle et de l'inciter à la copulation. En termes chimiques, la plupart de ces phéromones sont des alcools insaturés à longue chaîne ou des acides carboxyliques (37). D'autres substances ont un rôle de défense ou d'alarme. Par exemple, un sesquiterpène, le Germacrène A, est une substance alarme pour certaines



espèces de pucerons qui le libère lorsqu'ils sont attaqués par un prédateur, signalant ainsi le danger aux autres individus dans le voisinage (38).

Du point de vue enzymatique, le métabolisme secondaire possède la plupart du temps son propre pool d'enzymes codées donc génétiquement. Néanmoins, certains systèmes enzymatiques du métabolisme primaire, qui présentent peu de spécificité pour leurs substrats, peuvent aussi réagir avec les intermédiaires du métabolisme secondaire. Tel serait le cas de certains alcools dehydrogénase (39).

Le métabolisme secondaire pourrait être en définitive la marque d'une adaptation ou d'une évolution biochimique des espèces face à l'environnement. Parmi les nombreuses molécules synthétisées, seules quelques unes présentent un avantage biologique évident et deviennent un caractère permanent de l'espèce.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires. Ces toxines ne semblent pas assurer aux champignons qui les élaborent une suprématie particulière. Les souches toxigènes d'une espèce déterminée ne s'assurent pas en effet sur les souches non toxigènes un avantage décisif. Par exemple une souche sur quatre seulement de *Aspergillus flavus* est capable d'élaborer l'Aflatoxine (40).

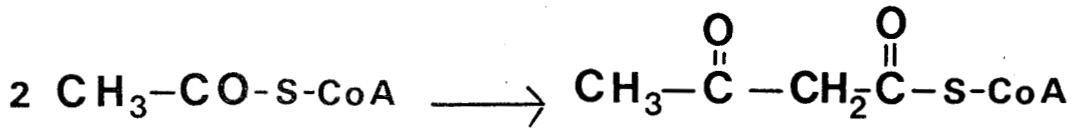
II - PRINCIPALES VOIES -

Les voies du métabolisme secondaire ont été classées à partir du précurseur du métabolisme primaire qu'elles utilisent.

L'acide acétique ou plutôt l'acétyl-CoA est un précurseur de nombreux composés secondaires. Il peut se condenser avec le malonyl-CoA pour donner l'acétylacétyl-CoA $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{-CO-S-CoA}$ qui intervient dans la synthèse des acides gras. Par continuation de ce processus on obtient de longues chaînes linéaires β -polycétoniques. Par des cyclisations de type aldolique, ces dernières peuvent produire une grande variété de produits naturels. Les substances dérivant de l'acide acétique par ce processus sont appelées Acétogénines. Cette voie est celle utilisée pour la synthèse des pigments floraux (flavone) ou d'antibiotiques (tétracyclines) ou de mycotoxines (aflatoxines).

Lorsque l'acide acétique se condense pour donner naissance à l'acide mévalonique, il conduit alors à une voie de synthèse très générale, celle des stérols. Nous détaillerons cette voie dans le chapitre suivant.

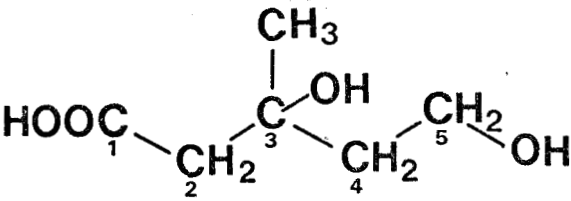
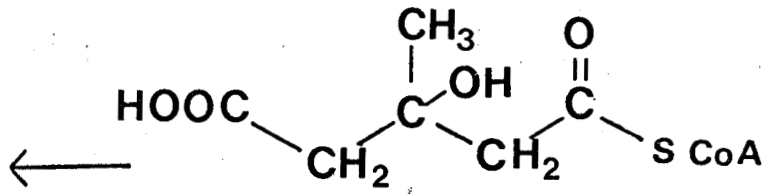
De même les sucres, quelques amino-acides servent de précurseurs à certains métabolites secondaires : le tryptophane, la phénylalanine ou la tyrosine se retrouvent dans le squelette de nombreux alcaloïdes.



Acétyl-CoA

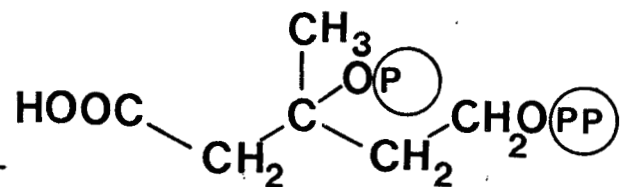
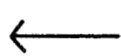
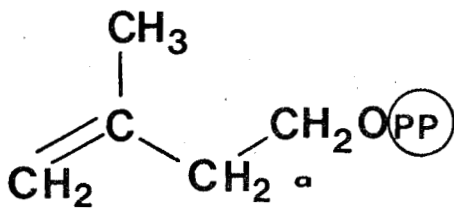
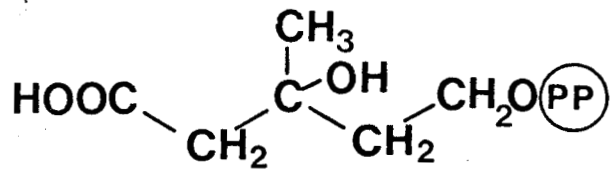
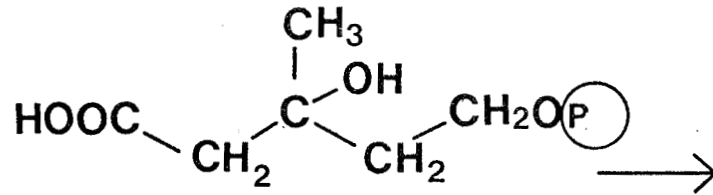
Acétoacétyl-CoA

Acétyl-CoA

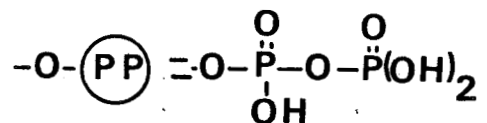
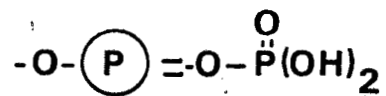


Acide mévalonique

β-Hydroxy-β-méthyl-glutaryl-CoA



Pyrophosphate d'isopentén-3-yle



B I O S Y N T H È S E D È S T E R P È N E S

I - ASPECTS GÉNÉRAUX -

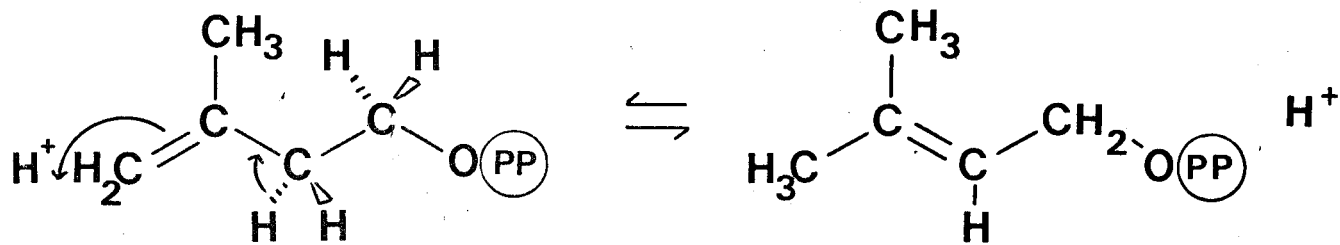
Les métabolites de *P. roqueforti*, nous l'avons vu au chapitre précédent, sont des sesquiterpènes. Nous allons, dans ce chapitre, rappeler brièvement quelques points essentiels liés à la biosynthèse de ces composés.

Les terpénoïdes forment une classe de substances naturelles organiques qui recouvrent une extrême diversité de structures (plus de 4000). Cette diversité cache une unité structurale profonde. Toutes ces molécules sont décomposables (sur la papier) en unités isopentaniques. Ceci conduit à une classification rationnelle :

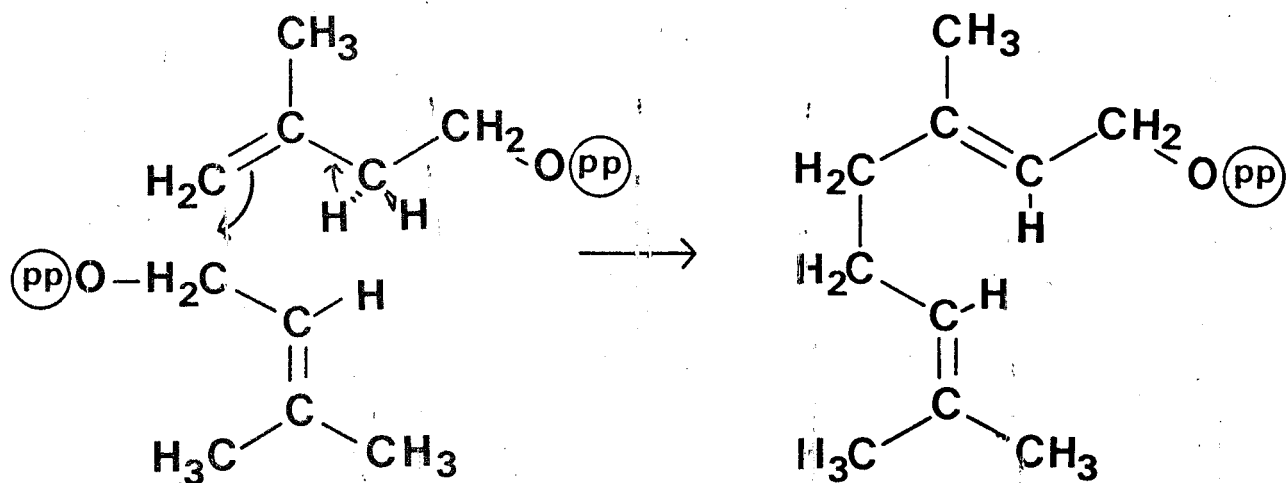
- C₁₀ Monoterpénoïdes
- C₁₅ Sesquiterpénoïdes
- C₂₀ Diterpénoïdes
- C₂₅ Sesterpénoïdes
- C₃₀ Triterpénoïdes
- C₄₀ Caroténoïdes
- C_{5n} Polyprénoïde

Le terme terpène (qui vient du nom de l'arbuste terebinthe) est en principe réservé aux hydrocarbures terpénoïdes, dans la pratique on parle indifféremment de terpènes ou de terpénoïdes.

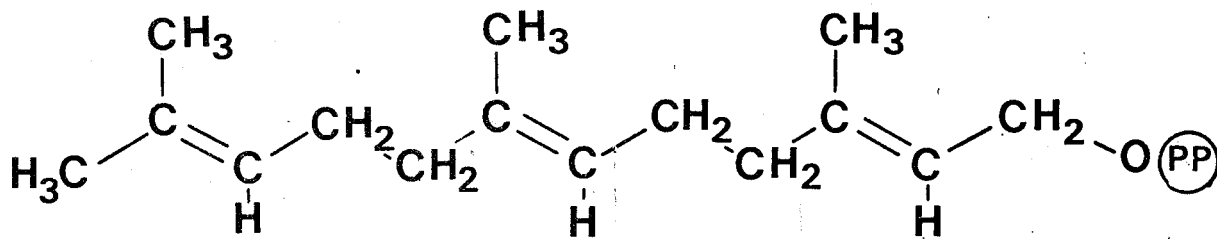
Tous les composés terpénoïdes sont issus du pyrophosphate d'isopentényle (cf. ci contre) dont la biosynthèse se fait à partir de l'acétyl-CoA de la même manière dans le régime animal ou le règne végétal.



Pyrophosphate d'isopentén-2-yle



Pyrophosphate de géranyle



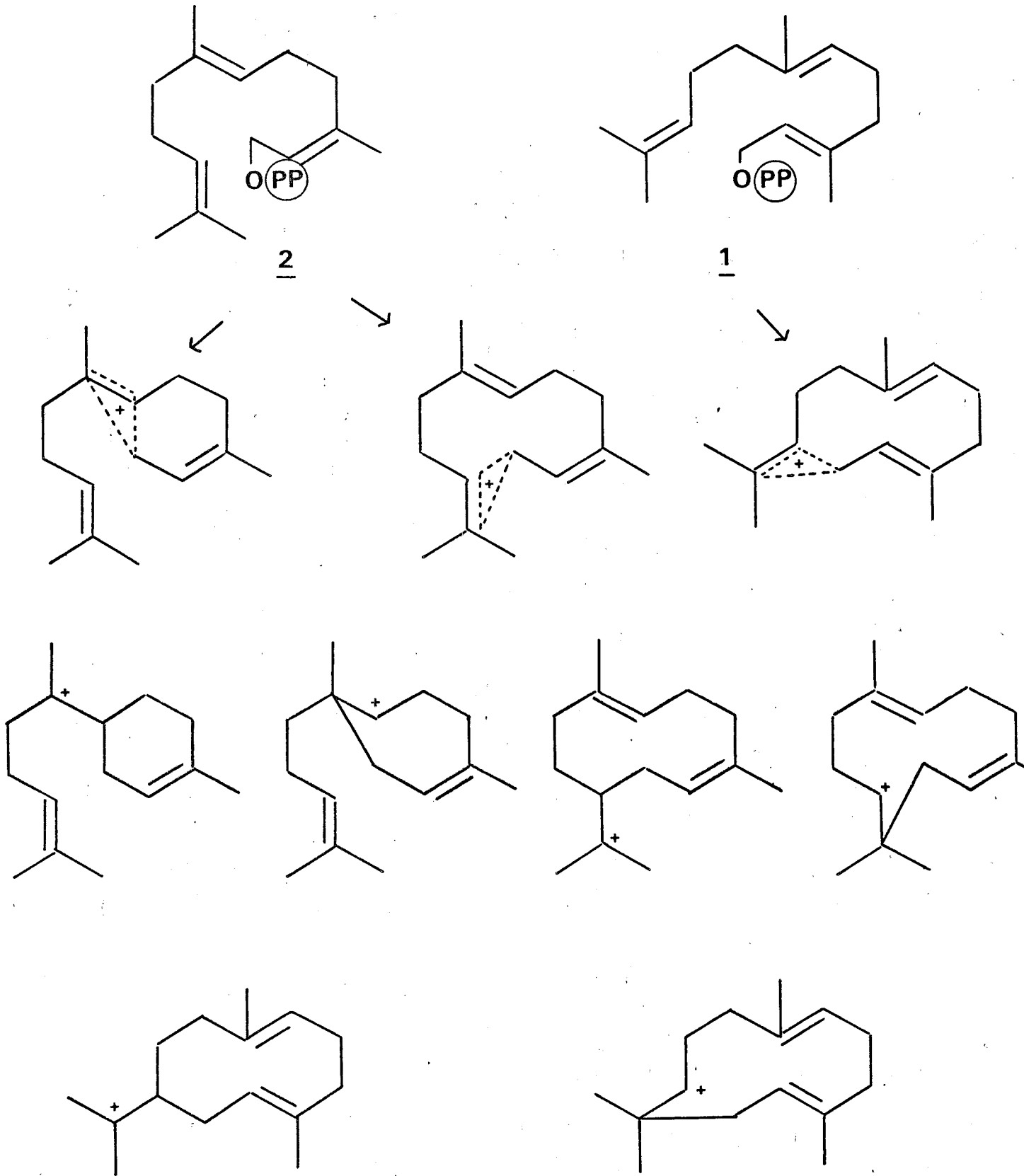
Pyrophosphate de farnésyle



L'acétoacétyl-CoA est formé à partir de deux molécules d'acétyl-CoA dans une réaction catalysée par une thiolase (41). Une troisième molécule d'acétyl-CoA s'additionne au carbonyle en position 3 de l'acétoacétyl pour former le β -hydroxy- β -méthyl-glutaryl-CoA qui est converti irréversiblement en acide mévalonique par une réductase. L'acide mévalonique est ensuite phosphorylé en deux étapes en pyrophosphate de l'alcool primaire. Une troisième phosphorylation sur l'alcool tertiaire fournit un intermédiaire très instable qui perd de l'acide phosphorique et se décarboxyle en pyrophosphate d'isopentèn-3-yle.

La synthèse des terpènes résulte de la polymérisation du pyrophosphate d'isopentényle. Le pyrophosphate d'isopentèn-2-yle (ou 3,3'-diméthylallyl pyrophosphate) qui est formé par isomérisation enzymatique de l'isopentèn-3-yle constitue le point de départ de cette polymérisation (42). Une molécule d'isopentényle s'additionne à une molécule de diméthylallyle. Le groupe pyrophosphate du diméthylallyle est éliminé. La condensation peut être considérée comme une substitution nucléophile par le groupe CH_2 du pyrophosphate d'isopentényle. Cette substitution produit une inversion de configuration du carbone porteur du groupement pyrophosphate. Le monoterpène formé au cours de cette réaction est le pyrophosphate de géranyle. L'addition d'une nouvelle molécule d'isopentényle par un mécanisme similaire conduit au précurseur des sesquiterpènes le pyrophosphate de farnésyle. Dans tous ces composés les configurations des doubles liaisons sont trans.

Les squelettes carbonés de pratiquement tous les sesquiterpènes peuvent être dérivés par une cyclisation convenable, soit du pyrophosphate de farnésyle trans (1), soit du pyrophosphate de farnésyle cis (2). La première étape de ces cyclisations est une ionisation du groupe phosphate assisté anchimériquement par la participation d'une double liaison terminale ou centrale conduisant à des ions non classiques (43). Bien sûr, ces intermédiaires sont purement hypothétiques, c'est seulement un formalisme pratique qui rend bien compte de la variété des squelettes observés. Ils ne doivent pas être considérés comme une représentation du processus enzymatique. Néanmoins, les systèmes enzymatiques peuvent parfois synthétiser ces sesquiterpènes par un processus partiellement ou totalement concerté à partir du pyrophosphate (43). Ces processus peuvent conduire avec des migrations d'hydrogène, de méthyles, des réarrangements à plus de cent squelettes carbonés qui représentent plus de 1000 sesquiterpènes connus (44).

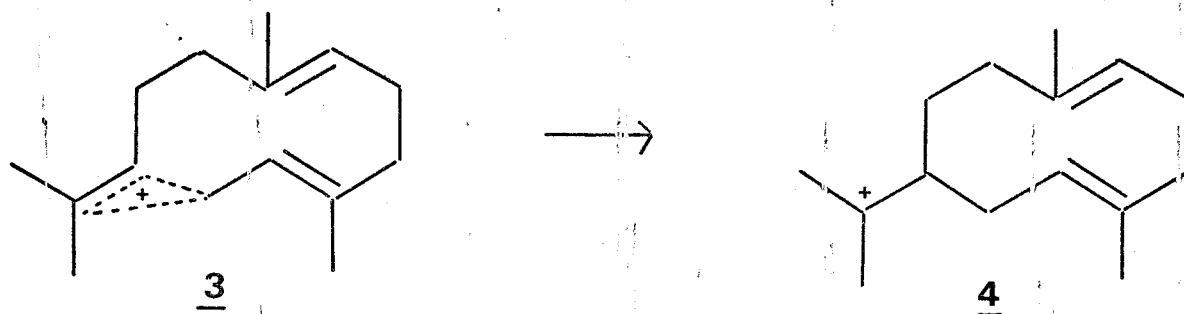


Intermédiaires ioniques hypothétiques précurseurs
de quelques sesquiterpènes

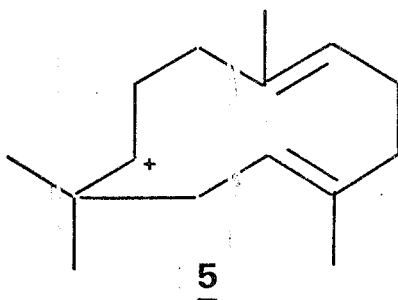
II - BIOSYNTHESE DES SESQUITERPENES DE TYPE EREMOPHILANE -

Nous allons examiner en détail les étapes successives qui aboutissent au squelette éremophilane.

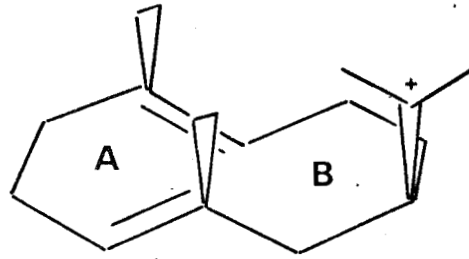
Un cation du type indiqué ci-dessous est le précurseur de la série eudesmane, dont le réarrangement conduit au squelette éremophilane :



J.B. HENDRICKSON (45) fut le premier à rationaliser en terme de facteurs électroniques et stériques la formation et l'évolution de ces espèces cationiques . L'espèce 3 a une conformation unique qui est dictée simplement par un recouvrement maximum de l'orbitale π et par des contraintes stériques minimum. Le cation 4 est favorisé stériquement et électroniquement par rapport au cation 5 qui provient également de 3 :



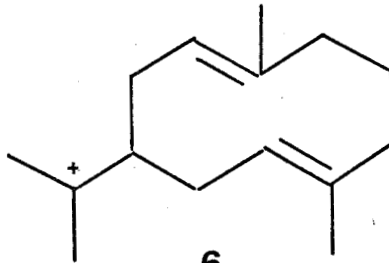
La cyclisation du cation 4 obéit également à des considérations électroniques et stériques . Il existe une conformation dans laquelle les deux doubles liaisons sont proches et en bonne position pour une cyclisation :



4

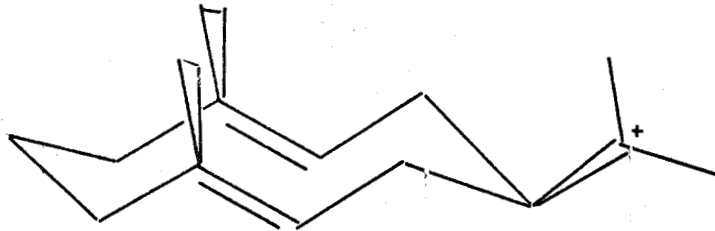
Cette conformation proposée par J.B. HENDRICKSON (45) montre, à l'examen à l'aide des modèles de DREIDING, une conformation chaise. Lorsque les deux doubles liaisons sont en bonne position, le groupe isopropyle (en cis β pour rendre compte de la stéréochimie la plus fréquemment rencontrée dans les composés à squelette eudesmane) est axial en forte interaction avec les deux méthyles. Cette interaction est diminuée si la partie B de cycle en C_{10} est en forme bateau.

J.B. HENDRICKSON (45), puis D.F. MACSWEENEY (46) ont fait intervenir une isomérisation du cation 4 en 6 (non enzymatique) :



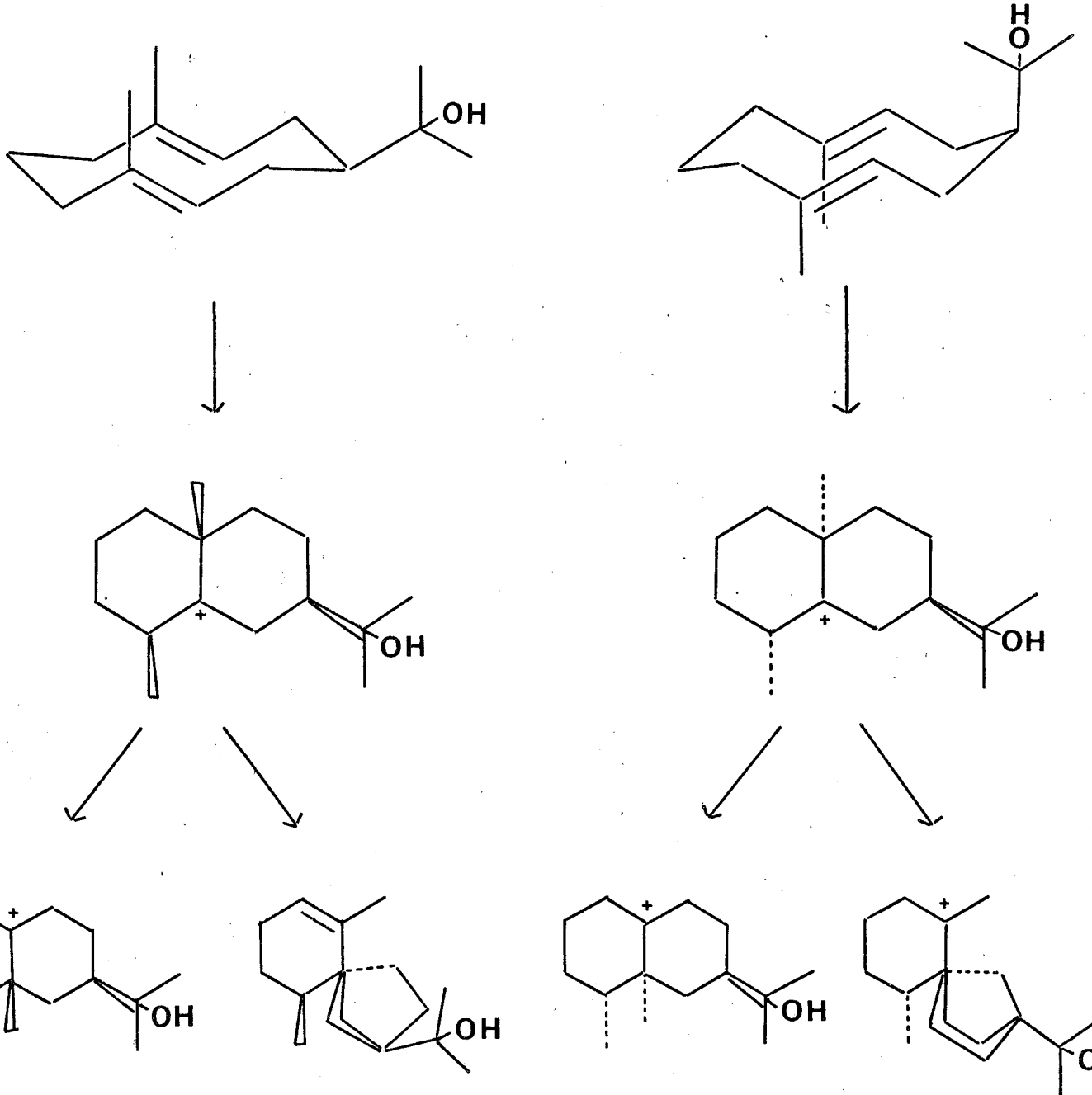
6

Ce cation 6 présente des interactions stériques moins importantes que 4. Sa forme chaise fait intervenir la chaîne isopropyle en position équatoriale comme le montre le modèle de DREIDING :



6a

Schéma de Mac Sweeney



éremophilane

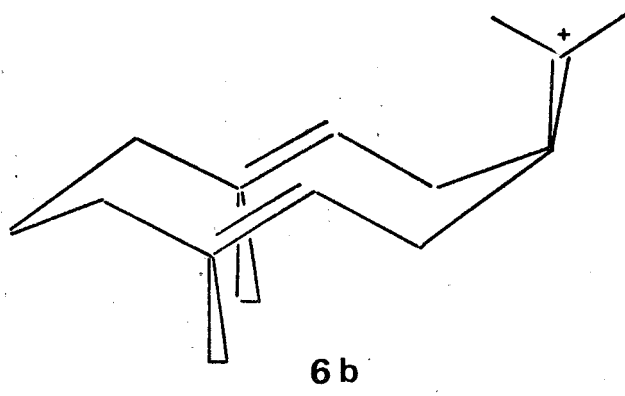
hinesol

valencane

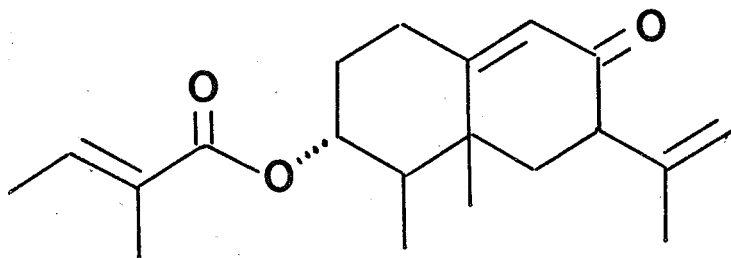
vetispirane



La cyclisation de ce conformère ou de l'autre forme chaîne 6b explique également l'ensemble des stéréochimies observées dans les composés érémophilane, Valencane (Nootkatane), Vétispirane comme l'a postulé D.F. MAC. SWEENEY (46) (voir ci-contre) :

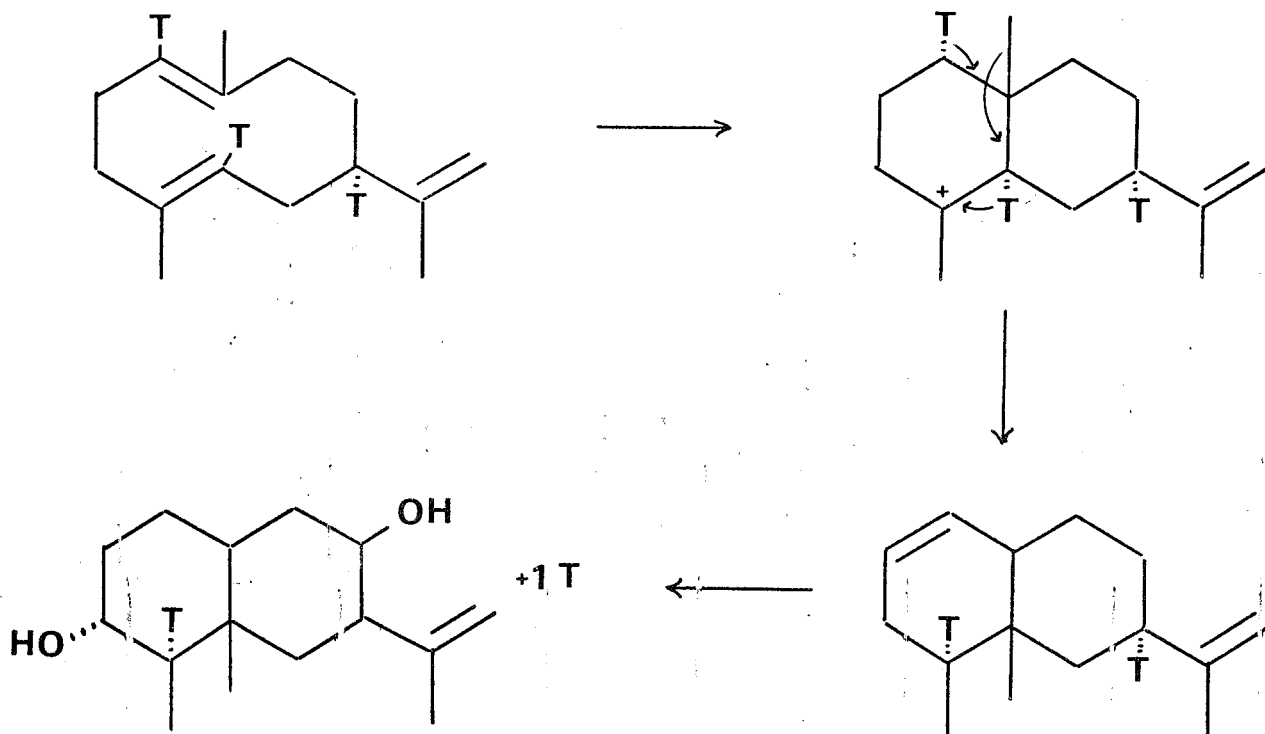


C.J.W. BROOKS et R.A.B. KEATES ont étudié la biosynthèse de la pétasine de squelette érémophilane :



Ils ont proposé un schéma (voir ci-contre) qui à partir du squelette eudesmane mène par une migration d'un méthyle angulaire au squelette érémophilane. Ce schéma s'appuie sur des incorporations d'acide mévalonique tritié en C-4 (47). Le marquage spécifique sur le carbone 4 (de la Pétasine) proposé dans ce schéma a été effectivement retrouvé indiquant que la migration du méthyle est accompagnée du déplacement du proton de 5 en 4. Néanmoins, la perte des autres tritiums au cours des métabolisations du squelette conduisant à la Pétasine, ou des traitements chimiques ultérieurs ne permet pas de préciser davantage le mode de cyclisation et de réarrangement au cours de cette biosynthèse.

D.J. DUNHAM (48) a proposé un mécanisme pour le réarrangement eudesmane → érémophilane impliquant des intermédiaires spiro. Cette hypothèse a été récemment écartée par BROOKS à l'aide du marquage au carbone 13 (49). Nous expliciterons ces hypothèses dans le chapitre suivant.



Dérivé de réduction de la pétasine

Schéma de biosynthèse de la Pétasine selon BROOKS



Le squelette carboné d'une molécule obtenue dans ces conditions se retrouve généralement dans le même état d'oxydation que le composé de départ. Les étapes ultérieures des biosynthèses des terpènes consistent en réactions d'oxydations (utilisant très fréquemment l'oxygène moléculaire), de réduction, ou parfois même en addition d'halogènes (chlore et brome principalement) (50). On conçoit aisément la grande variété structurale que l'on peut observer après ces multiples transformations d'un précurseur commun.

BIOSYNTHESE DES SESQUITERPÈNES

de *P. roqueforti*

I - BIOSYNTHESE DU SQUELETTE CARBONE - ETUDE PAR INCORPORATION DE CARBONE 13 -

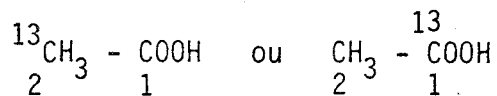
1° -APPLICATION DE LA R.M.N. DU ^{13}C A L'ELUCIDATION DES VOIES DE BIOSYNTHESE -

La principale technique utilisée pour l'étude des chemins biosynthétiques de divers composés était l'incorporation de précurseurs radioactifs ^{14}C ou ^3H . Cette technique laborieuse nécessitait une dégradation chimique pour localiser sur une molécule les atomes marqués.

La R.M.N. du ^{13}C permet de suivre l'incorporation d'atome de ^{13}C d'un précurseur dans une molécule en évitant une dégradation chimique.

Le carbone 13 présente une abondance naturelle de 1,1% qui est suffisante pour observer un spectre de R.M.N. du ^{13}C de tout composé. Ce spectre se traduit par des raies d'absorptions caractéristiques des différents carbones. Chaque carbone se présente sous forme d'une raie si l'on supprime simultanément les couplages dus aux protons, par irradiation.

Dans ces conditions, un enrichissement en carbone 13 de certains carbones d'un composé à partir d'un précurseur enrichi en ^{13}C se révèle dans le spectre de R.M.N. par une augmentation de l'intensité des raies concernées. Cette propriété a donc été utilisée pour suivre dans divers squelettes carbonés les devenir des carbones 1 ou 2 de l'acide acétique utilisé comme précurseur, par exemple :

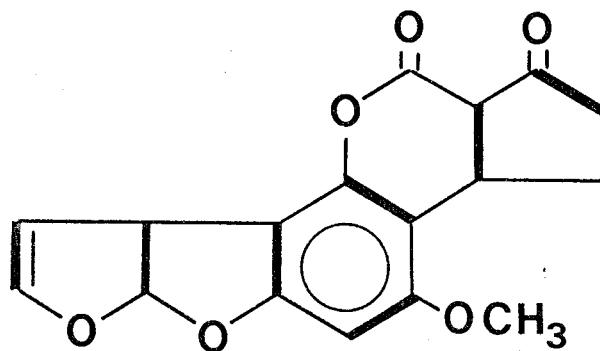


Mais cette technique fut particulièrement riche de renseignements lorsque on a disposé d'acétate de sodium dont les deux carbones sont enrichis à 90% en ^{13}C .

En effet, deux carbones ^{13}C voisins dans une même molécule présentent un spectre de R.M.N. ^{13}C caractéristique résultant du couplage entre ces deux carbones. Ces deux carbones se présentent sous la forme d'un doublet repérable grâce à une constante de couplage identique.

Un composé enrichi en acétate doublement marqué au ^{13}C présente un spectre R.M.N. où certains pics d'abondance naturelle sont entourés par deux bandes latérales du doublet donnant au signal une allure de triplet.

Comme il est très peu probable (avec un pourcentage d'incorporation du précurseur faible) (55) que dans une même molécule, deux unités d'acétate soient voisines, les couplages que l'on observe sont donc uniquement dus aux carbones provenant d'une molécule d'acétate ^{13}C incorporée. On peut donc dans une molécule enrichie suivre ainsi les enchaînements des molécules d'acétate, sur un squelette déterminé. Dans le cas des mycotoxines, de très nombreux travaux concernent la biosynthèse de l'Aflatoxine. Ci-dessous est indiqué l'enchaînement des molécules d'acétate dans le squelette de l'Aflatoxine obtenu par STEYN et coll. (51) :

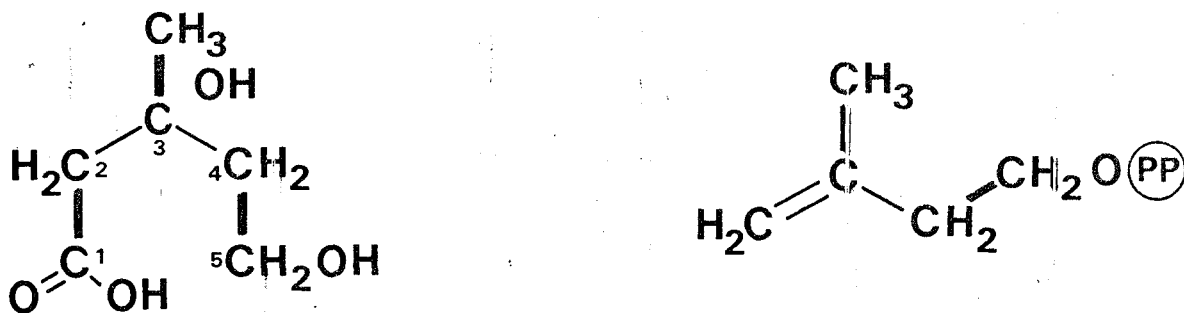


AFB₁

Cette méthode est encore susceptible d'apporter des renseignements complémentaires tout aussi précieux que l'enchaînement des unités acétate.

En effet, toute unité acétate qui sera, au cours d'un processus biosynthétique, l'objet d'une coupure, se remarquera dans le spectre du composé examiné par l'absence des couplages, donc de bandes latérales, et par une augmentation d'intensité des carbones repérés.

Cet aspect nous intéresse particulièrement dans le cas de la biosynthèse des terpènes. Nous avons vu précédemment que l'acide mévalonique était synthétisé à partir de trois molécules d'acétates. Nous avons vu également que la synthèse du pyrophosphate d'isopentényle se fait par perte d'un carbone (le C-1 de l'acide mévalonique). Le schéma suivant montre comment sont réparties les molécules d'acétates dans des deux espèces :



Acide mévalonique

Nous voyons immédiatement que le passage acide mévalonique, pyrophosphate d'isopentényle se fait avec coupure de la liaison carbone-carbone d'une molécule d'acétate.

Il est ainsi aisé dans une molécule terpénique dont la biosynthèse est effectuée à partir d'acétate doublement marqué, non seulement de repérer l'enchaînement des molécules d'acétate mais encore de détecter immédiatement les carbones issus du C-2 de l'acide mévalonique par l'absence de couplage. Eux seuls dans un tel spectre se présenteront sous la forme de singulets.

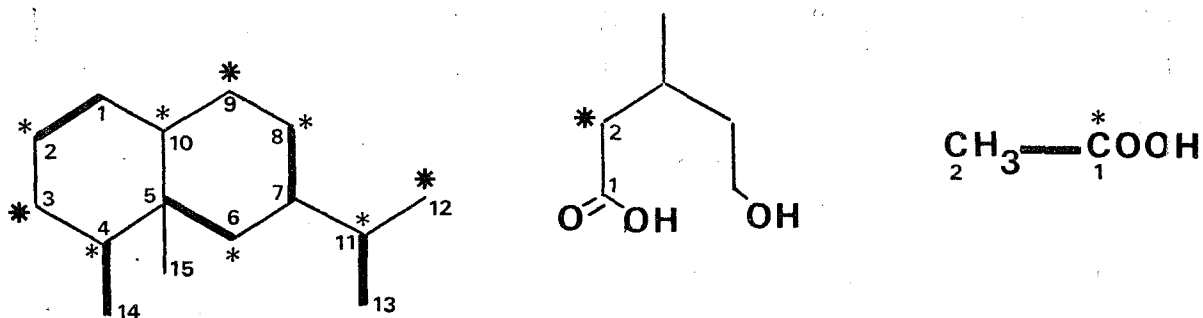
Il en va de même pour tout réarrangement qui fera intervenir une coupure carbone-carbone d'une unité acétate.

Dans le cas des sesquiterpènes et plus particulièrement dans celui du squelette éremophilane, il était utile d'étudier le réarrangement envisagé dans le paragraphe précédent.

2° - BIOSYNTHESE DE LA PR TOXINE - ETUDE DE L'INCORPORATION
D'ACETATE DE SODIUM CH₃ - ¹³COONa -

Nous avons, dans un premier temps, entrepris cette étude pour mettre au point une méthode d'incorporation avec un précurseur peu onéreux. Ceci pouvait également nous permettre d'affecter dans le spectre du carbone 13 d'abondance naturelle les valeurs exactes des signaux des carbones époxydiques 1 et 2 de PRT (voir chapitre "Structure EA").

Le schéma indique dans le squelette carboné de PRT l'origine des divers carbones.

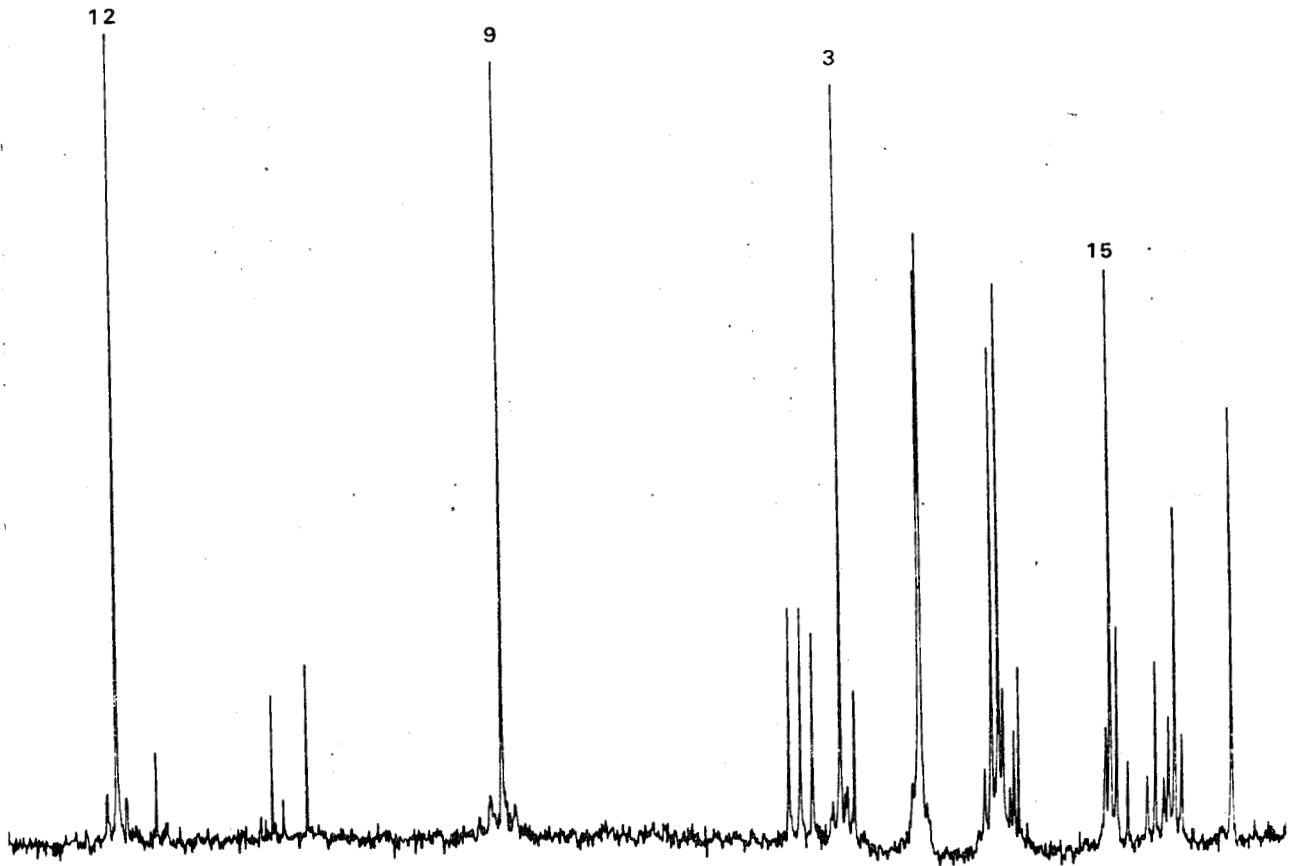


L'incorporation du précurseur a été réalisée en ajoutant stérilement dans le milieu de culture, une solution d'acétate de sodium au 4ème, 6ème, 8ème, 10ème, 12ème jour de la culture. La culture est extraite au 14ème jour. La PRT est purifiée et cristallisée par les méthodes habituelles.

Les spectres R.M.N. du ¹³C du composé marqué et d'un échantillon non marqué sont enregistrés dans des conditions identiques.

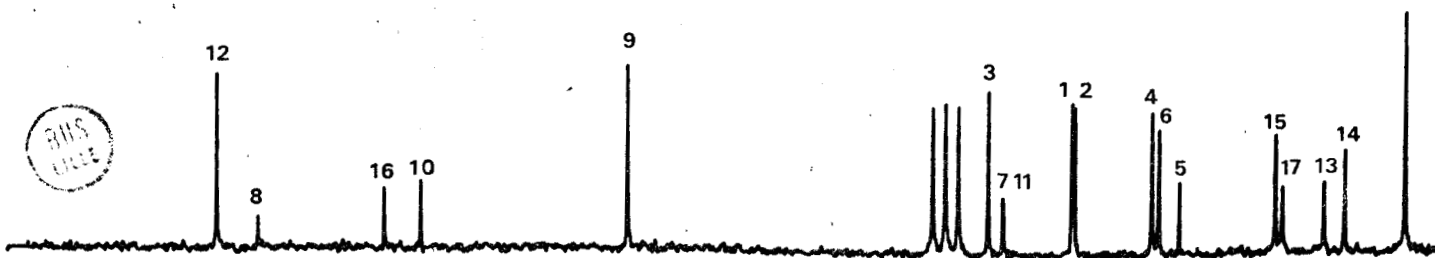
Le résultat le plus caractéristique est l'augmentation du signal à $\delta = 55,2$ qui correspond donc au C-2 de PRT. On note également une augmentation des signaux C-4 et C-6. L'augmentation attendue des signaux C-11, C-8, C-10 n'est pas mesurable avec certitude.

PRT marqué



15 MHz

PRT non marqué



3° - ETUDE DE L'INCORPORATION DE L'ACETATE DE SODIUM ¹³C 1-2
90% -

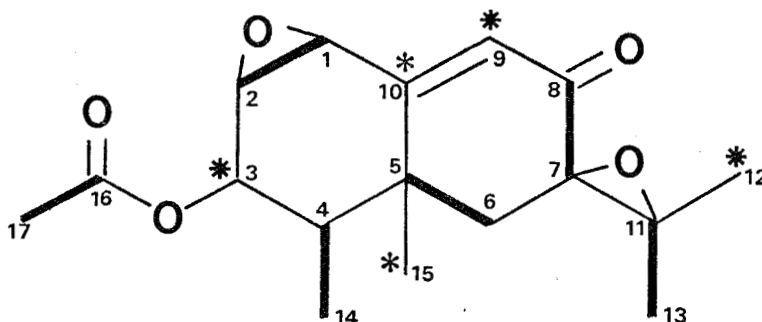
L'incorporation est réalisée dans les conditions identiques à celles utilisées pour l'acétate ¹³C-1.

La page ci-contre donne les spectres à 15 MHz de PRT incorporé et non incorporé .

Un examen rapide montre la présence de 4 singulets internes correspondant au C-15 (21,9 ppm), C-3 (69,9 ppm), C-9 (130 ppm), C-12 (198,7 ppm). Les autres pics montrent des bandes latérales plus ou moins analysable. Dans le but d'améliorer l'analyse de ces couplages, nous avons procédé à une mesure à haut champ (90,7 MHz). Le spectre obtenu est plus aisément interprétable (cf. ci-contre) et les constantes de couplage sont mesurables avec précision.

- J C-1, C-2 = 25 Hz
- J C-4, C-14 = 36 Hz
- J C-5, C-6 = 34 Hz
- J C-7, C-8 = 52 Hz
- J C-11, C-13 = 45 Hz
- J C-16, C-17 = 59 Hz

Le schéma suivant montre que les couplages observés sont bien en accord avec le schéma théorique de la page (94) :

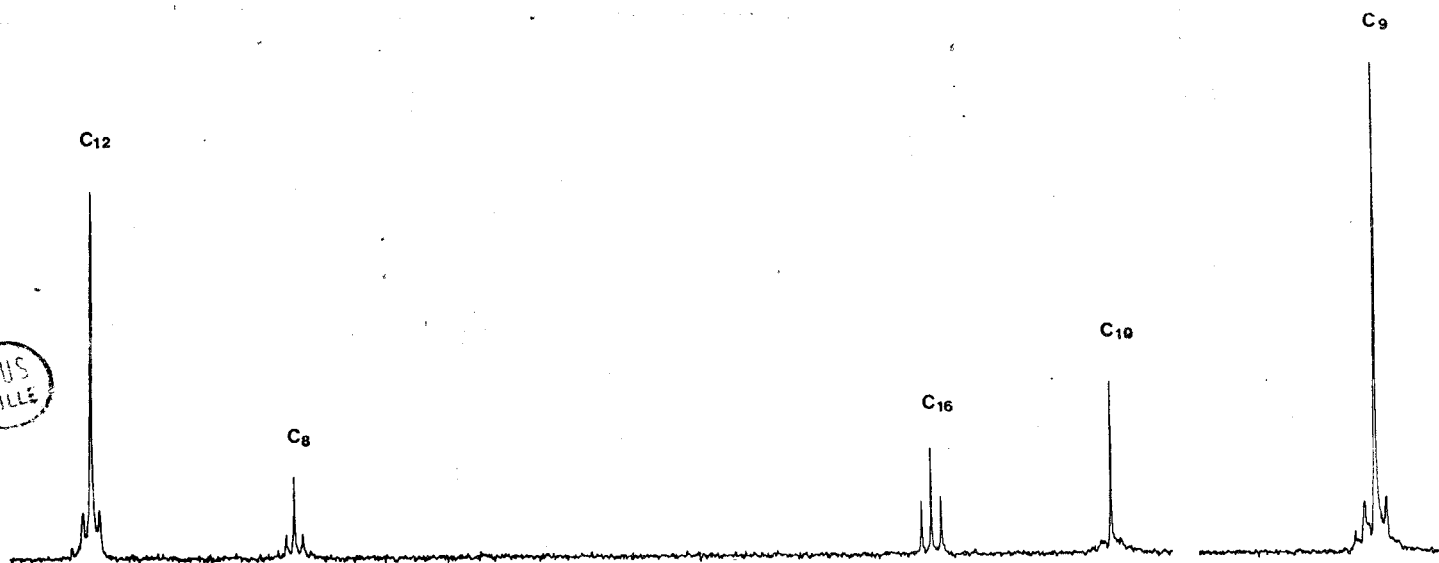
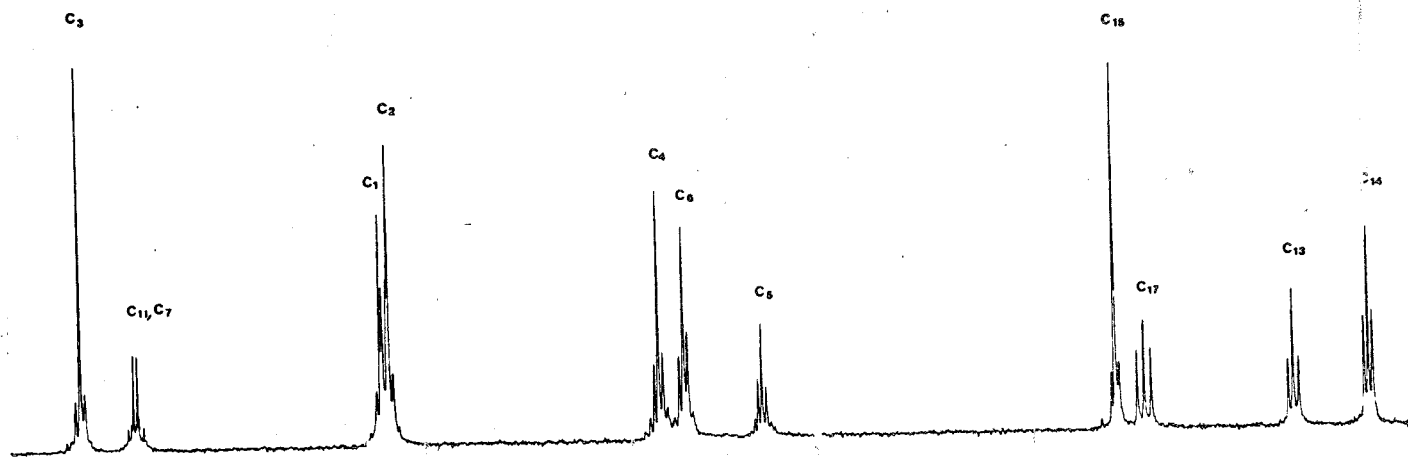
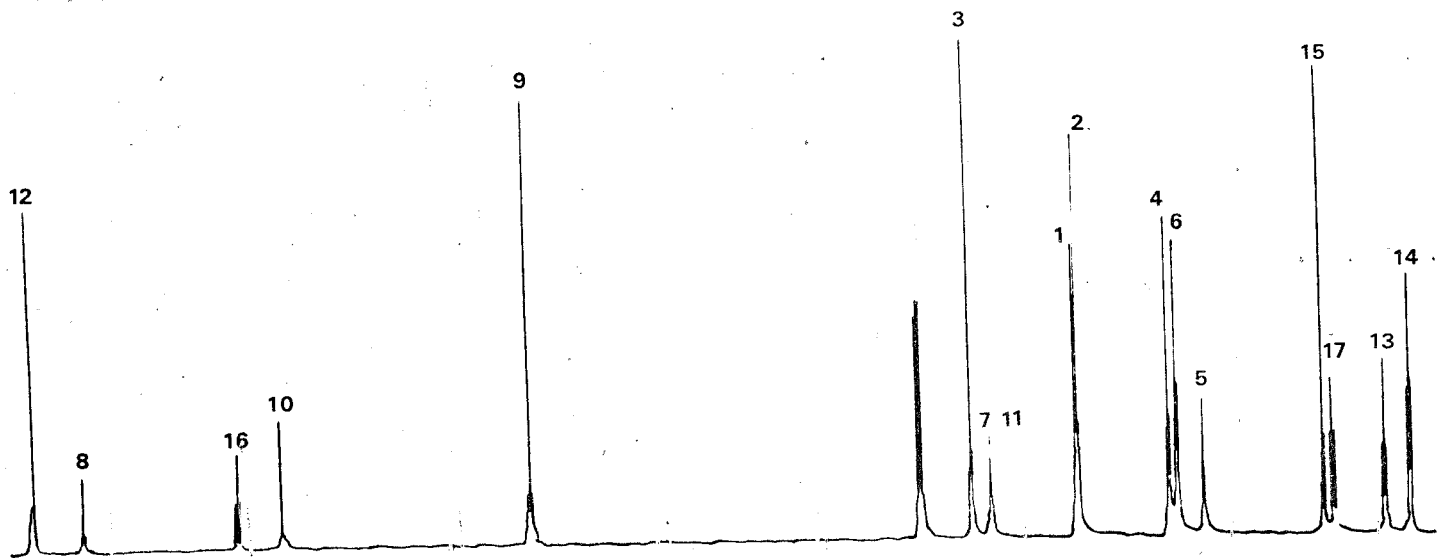


** C - singulets

RMN ¹³C

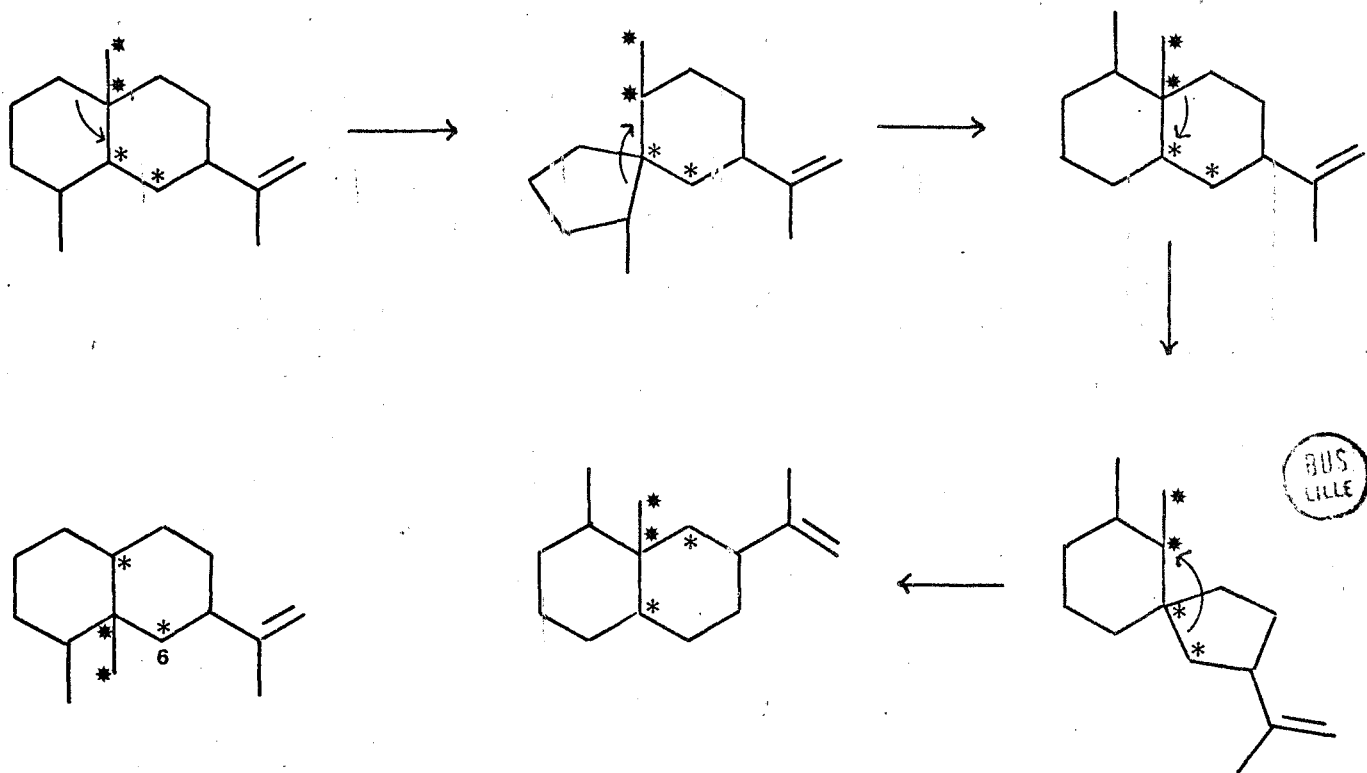
(90 MHz)

PRT marqué



BUS
LILLE

On repère aisément les carbones provenant du C-2 de l'acide mévalonique (3, 12, 9). Nous constatons aussi que la migration du méthyle 15 a bien impliqué une coupure de la liaison C-10, C-15 du squelette eudesmane comme l'a proposé C.J.W. BROOKS (49). L'hypothèse de D.J. DUNHAM (48) qui fait intervenir les intermédiaires spiro est dans ce cas également écartée.



**** , ** C issus d'une même molécule d'acétate**

On observe un couplage pour le C-6 qui, dans l'hypothèse de D.J. DUNHAM serait un singulet.

On peut également obtenir de l'examen de ce spectre une mesure du pourcentage d'enrichissement à chaque carbone. Les intensités des bandes satellites permettent de définir un pourcentage d'incorporation. Le calcul se définit ainsi :

I_C est l'intensité du pic central

I_L est la somme des intensités des bandes latérales

L'acétate de sodium utilisé est enrichi à 90% en ^{13}C , c'est-à-dire que l'on a :

- 81% de molécules $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$
- 18% de molécules $^{13}\text{C}-^{12}\text{C}$ ou $^{12}\text{C}-^{13}\text{C}$
- 1% de molécules $^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$

Il y a donc dans le pic central, dû à l'abondance naturelle, une contribution non négligeable due à des molécules marquées sur un carbone. Cette contribution représente 18/81 de l'intensité des pics latéraux, donc l'intensité réelle due à l'abondance naturelle est :

$$I_N = I_C - \frac{18}{81} I_L$$

tandis que le pourcentage d'incorporation à chaque carbone est fourni par la formule :

$$\% = 1,1 \frac{I_L}{I_N}$$

Le tableau suivant rassemble nos résultats :

Incorporation		Abondance totale en ^{13}C	
	%		%
C-1	2,95		4,05
C-2	1,13		2,23
C-4	1,02		2,12
C-5	1,91		3,01
C-6	1,15		2,25
C-8	0,31		1,91
C-13	1,67		2,77
C-14	2,2		3,3
C-16	1,95		3,05
C-17	1,83		2,93

La précision de ces mesures repose principalement sur une bonne séparation des bandes latérales et des pics centraux. Les mesures les moins précises sont celles des carbones 1, 2 et 5.

Un examen plus attentif du spectre montre que les pics 15, 3, 9, 12 théoriquement singulets, présentent des bandes latérales d'intensités faibles mais non négligeables. De même, les carbones 4, 6 et 5 montrent des bandes latérales supplémentaires de chaque côté de celles attendues. Ces bandes ne peuvent être dues qu'à des couplages ^{13}C , ^{13}C .*

Une analyse simple doit nous permettre de comprendre et de calculer la probabilité pour que les deux carbones voisins soient marqués au ^{13}C . Pour simplifier notre analyse prenons le cas d'une molécule de deux carbones $\text{C}_1\text{-C}_2$.

Il existe deux états pour un carbone ^{12}C ou ^{13}C :

- Nous appelons P_1 la probabilité pour que le carbone 1 soit ^{13}C , $1-P_1$ est la probabilité pour qu'il soit un ^{12}C .
- Nous appelons P_2 la probabilité pour que le carbone 2 soit ^{13}C , $1-P_2$ qu'il soit un ^{12}C .
- La probabilité pour que C_1 et C_2 soient tous les deux ^{13}C est $P_1 \times P_2$, elle est égale à la probabilité que le C_1 soit un doublet en R.M.N. :

$$P_1 \times P_2 = P_{1d} = P_{2d}$$

- La probabilité pour que C_1 soit ^{13}C et C_2 un ^{12}C est :

$$P_1 \times (1 - P_2) = P_{1s}$$

c'est la probabilité que le C_1 soit un singulet en R.M.N..

- La probabilité que C_1 soit un doublet ou un singulet est bien

$$P_1 = P_{1s} + P_{1d}$$

* Nous avons vérifié que dans les conditions des mesures, les bandes latérales ne pouvaient être des bandes de rotation (écart non constant et non égal à la fréquence de rotation, absence de ces mêmes bandes sur le pic TMS).

Nous pouvons prévoir les intensités relatives des signaux singulet ou doublet.

Le rapport intensité du singulet/intensité singulet + doublet pour C_1

$$P_{1s}/P_{1s} + P_{1d} = \frac{P_1(1 - P_2)}{P_1} = 1 - P_2$$

Le rapport intensité du doublet/intensité singulet + doublet pour

$$C_1 = \frac{I_d}{I_d + I_s}$$

$$P_{1d}/P_{1s} + P_{1d} = \frac{P_1 \times P_e}{P_1} = P_2$$

c'est la probabilité pour que le C_2 soit un ^{13}C .

Nous avons mesuré des intensités doublet/signal total de 0,22 à 0,28 pour les bandes satellites des carbones 12 et 15 de PET (ces carbones ne présentent qu'un carbone voisin).

$$P_2 = 0,22 \text{ ou } 0,28$$

Si nous calculons ce rapport d'intensité $\frac{I_d}{I_d + I_s}$ pour une abondance naturelle = 0,01 = $P_1 = P_2$,

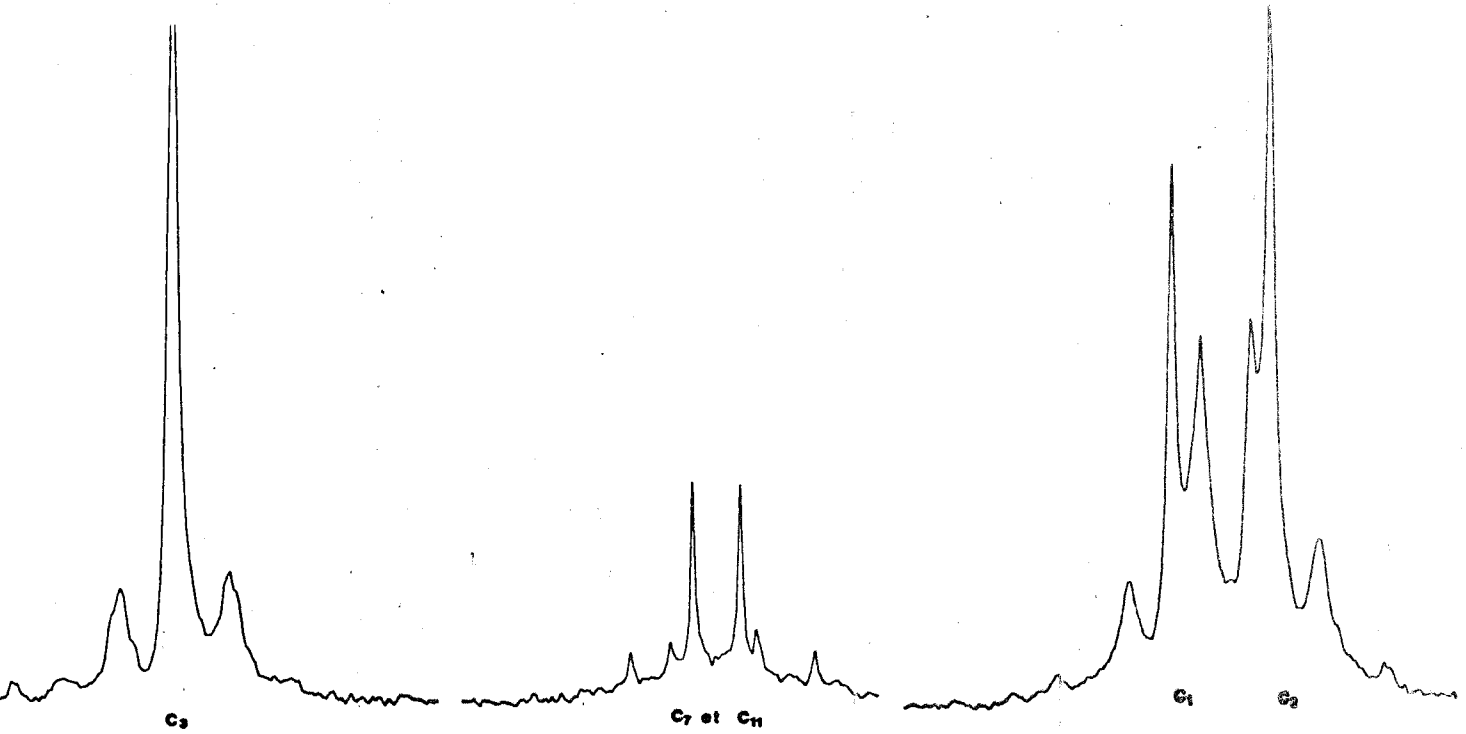
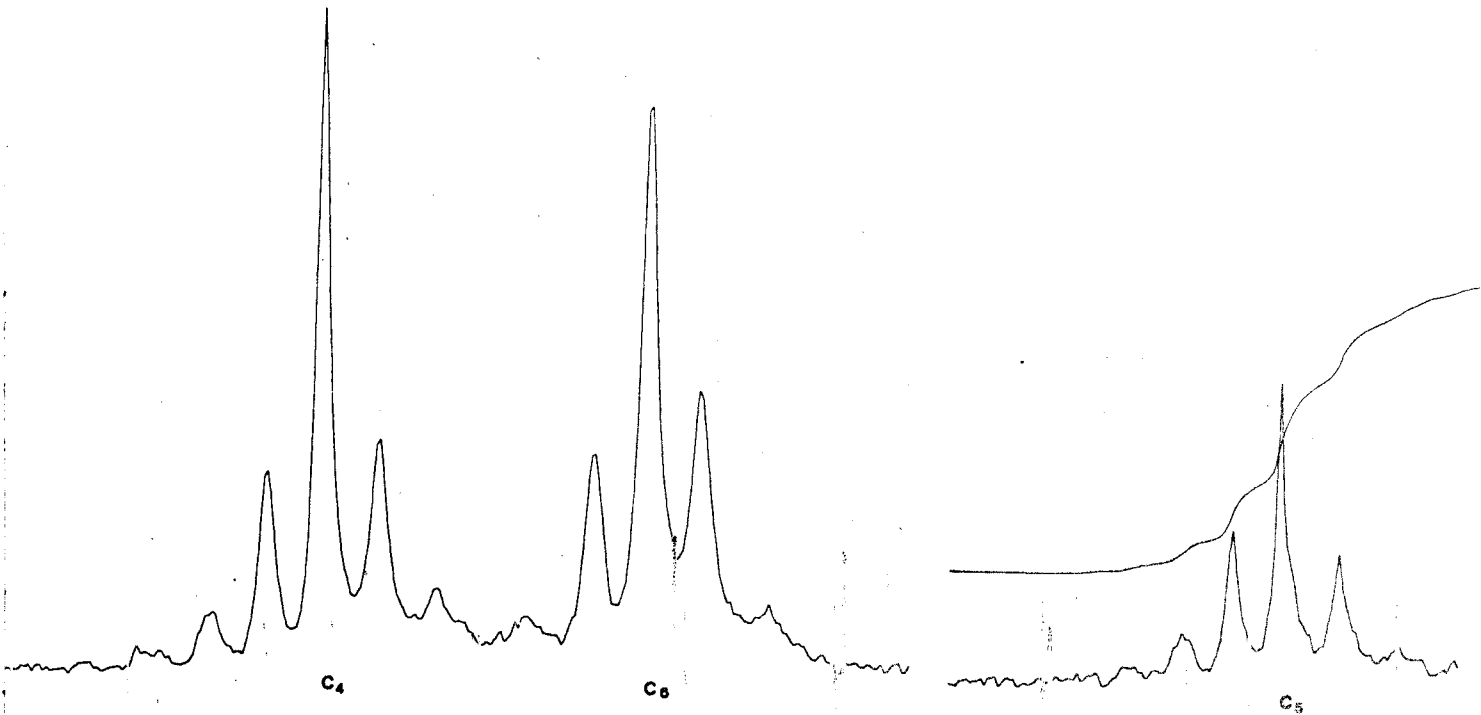
nous trouvons :

$$\frac{0,01 \times 0,01}{0,01} = 0,01$$

Si nous utilisons les pourcentages d'incorporations obtenus dans notre expérience, en faisant l'approximation que le marquage est uniforme, le pourcentage moyen d'incorporation est 2,7% = 0,027, ce qui donne :

$$\frac{I_d}{I_d + I_s} = 0,027$$

Nous constatons que ces chiffres sont très éloignés de ceux obtenus expérimentalement (0,22 et 0,28). La valeur de 2,7% obtenue est une valeur statistique sur le lot de molécules. Elle ne signifie pas que chaque molécule contient 2,7% de ^{13}C . La mesure expérimentale nous incite à penser qu'il existe des molécules très enrichies en ^{13}C pour lesquelles la probabilité de présence de deux ^{13}C voisins n'est pas négligeable, mais le mélange avec un lot de molécules faiblement enrichies ou à une abondance naturelle aboutit à un taux global d'enrichissement de 2,7%. Ces molécules très enrichies seraient responsables de l'apparition dans le spectre des couplages ^{13}C , ^{13}C autres que ceux dus à l'incorporation du précurseur., acétate doublement marqué. La probabilité de ces cou-



BUS
JLLE

plages augmente avec le nombre de carbones voisins d'un même carbone : ainsi C-5 (4 carbones voisins) présente en plus du couplage C-5, C-6 des bandes supplémentaires d'intensité non négligeable (voir figure), de même pour C-4 et C-6. Par contre, C-16, C-17 qui ne peuvent comporter d'autres voisins présentent uniquement le couplage attendu. Nous avons donc affaire à une incorporation non statistique.

Sur le plan biologique, il est intéressant d'expliciter ce phénomène. Le champignon synthétise ses terpènes à partir de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA provient très majoritairement de la dégradation des sucres (seule source de carbone importante dans nos cultures).

La dégradation des sucres aboutit à un acétyl-CoA qui est localisé dans la mitochondrie. La synthèse de terpénoïdes et stéroïdes a lieu dans le cytoplasme. L'acétyl-CoA ne peut traverser tel quel la membrane mitochondriale, ce passage a lieu par transformation en citrate à partir de l'oxaloacétate. Le schéma ci-contre résume nos connaissances actuelles sur la localisation cellulaire des systèmes enzymatiques concernés (52).

L'acétate extracellulaire, éventuellement présent s'il passe la membrane plasmique, est transformé en acétyl-CoA par un acétyl-CoA synthétase cytoplasmique (53). Il est alors utilisé par la cellule pour ses diverses synthèses (acides gras, cholestérol, etc...).

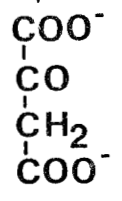
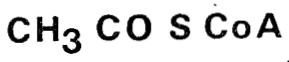
Lorsque les deux mécanismes de synthèse de l'acétyl-CoA sont en compétition, la voie la plus rapide est celle de l'acétate extracellulaire (53). L'acétate mitochondrial n'est mobilisable qu'après un échange avec l'oxaloacétate.

Le fait donc d'ajouter à notre milieu de culture de l'acétate de sodium, fait que celui-ci est immédiatement utilisé préférentiellement à l'acétyl-CoA provenant de la dégradation des sucres.

Nous avons donc un lot de molécules fortement enrichies qui sont alors élaborées. L'acétate externe épuisé, la voie de dégradation du glucose est uniquement utilisée et conduit à une dilution des molécules enrichies par des molécules naturelles.

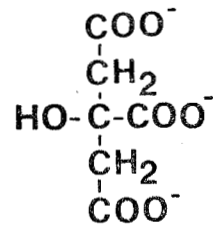
Bien que nous ayons ajouté l'acétate de sodium ^{13}C par fractions sur une durée de dix jours, nous avons abouti à un mélange de molécules très enrichies (synthétisées immédiatement après addition) et de molécules non enrichies (synthétisées entre chaque addition). Ceci permet de dire qu'il est nécessaire de diluer le précurseur marqué par le même précurseur non marqué, pour ne pas observer de couplages multiples qui peuvent compliquer le dépouillement des mesures. Ceci

Pyruvate

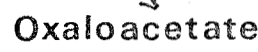


Oxaloacétate

Mitochondrie



Citrate

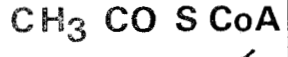


Cytoplasme

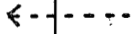
Acides gras



Malonate



Acétate



Mevalonate

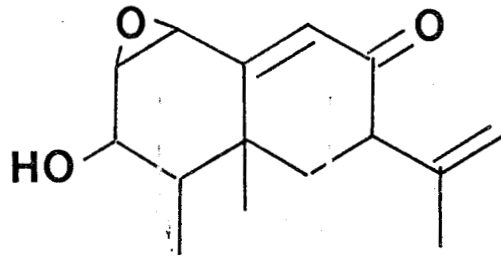
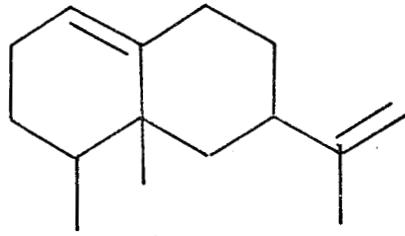
Terpenoïdes

Milieu

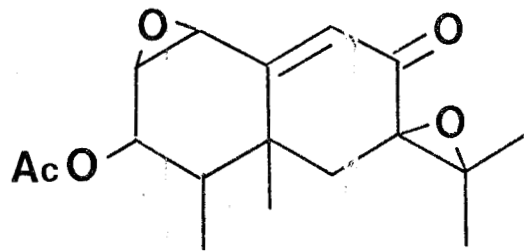
exterieur



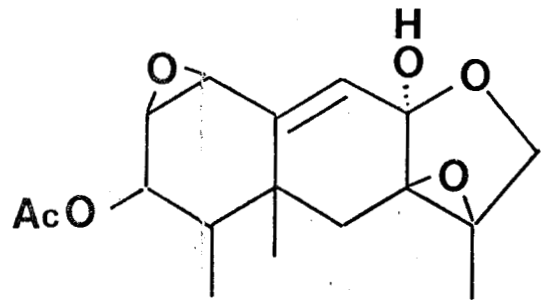
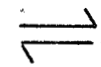
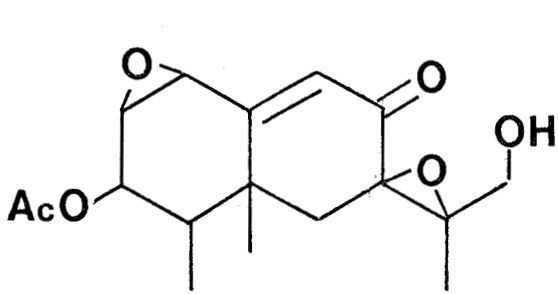
Hypothétique non isolé



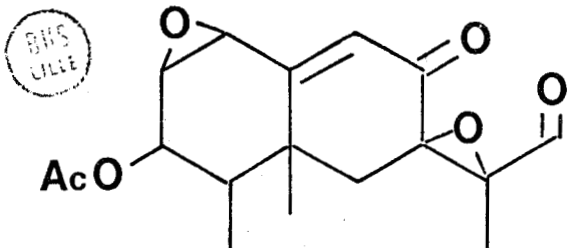
EB



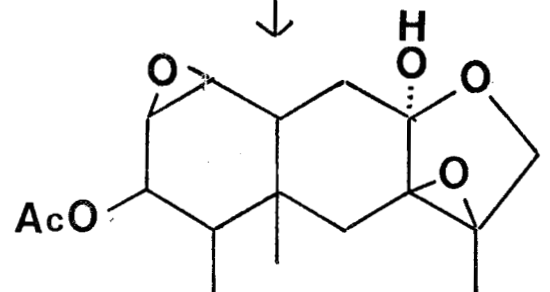
EA



EC



PRT



ED

BMS
LILLE

est en contradiction avec la conclusion de R.E. LONDON (55) qui estime que la dilution par le Pool naturel d'acétate est suffisante.

II - ETUDE CINETIQUE DE LA PRODUCTION DES METABOLITES DE *P. roqueforti*

1° - SCHEMA HYPOTHETIQUE DE LA SEQUENCE DES METABOLITES DE *P. roqueforti* -

Lorsque le squelette d'un terpène est synthétisé, il subit une série de métabolisations qui aboutissent à un composé dont le degré d'oxydation est différent du composé parent. Cette métabolisation peut même conduire à une dégradation plus ou moins importante du squelette par perte de un ou plusieurs carbones.

L'examen des structures des divers métabolites isolés d'un même organisme (ou parfois d'organismes différents), permet très souvent de proposer une séquence hypothétique de l'ordre de synthèse des métabolites. Nous pouvons proposer pour les métabolites de *P. roqueforti* un tel schéma (cf. ci-contre).

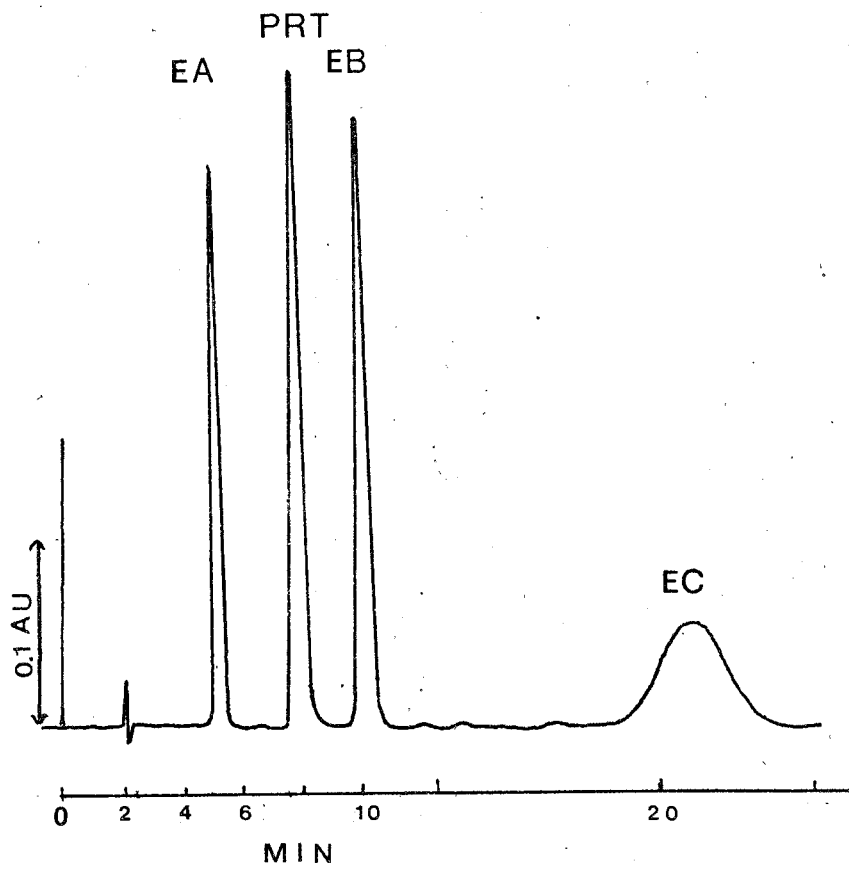
Le précurseur éremophilène n'a pas été isolé. Le premier métabolite caractérisé est EB. Le passage de EB à EA pourrait se faire par une suite d'étapes élémentaires : isomérisation de la double liaison 11-13 en 7-11, époxydation de cette double liaison, acétylation de la fonction hydroxyle en 3.

La transformation EA → EC se fait par une réaction d'hydroxylation en C-12.

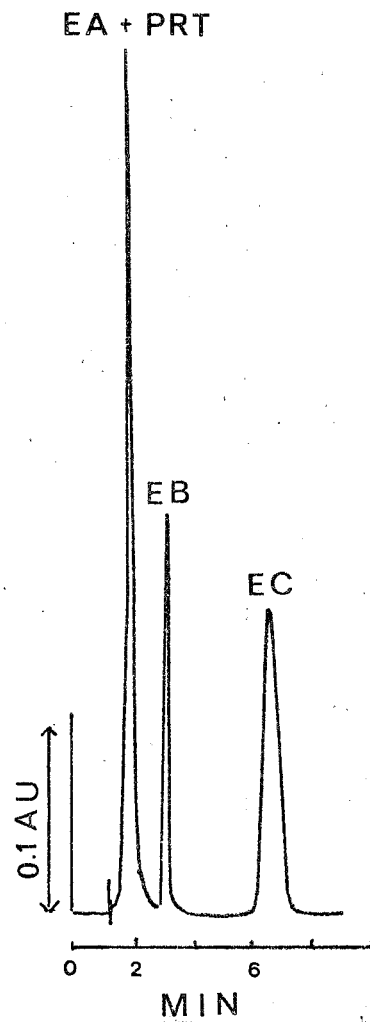
Le composé EC formé équilibre chimique entre deux formes peut conduire à PRT par oxydation de la fonction alcool en 12 ou en ED par réduction de la double liaison 9-10.

Il nous fallait donc confirmer ou d'infirmier un tel schéma par diverses techniques.

Les premiers composés d'une séquence métabolique étant formés chronologiquement les premiers, une analyse séquentielle devrait en théorie détecter l'ordre dans lequel ces métabolites apparaissent. En pratique, les étapes successives se déroulent souvent avec une telle rapidité qu'il n'est pas toujours possible de distinguer l'ordre de synthèse des substances.



éluant A



éluant B

CLHP des métabolites



Néanmoins, nous avons tenté cette analyse pour les métabolites de *P. roqueforti*. Pour ce faire nous avons, dans un premier temps, à mettre au point une méthode de dosage de ces métabolites.

2° - DOSAGE DES METABOLITES DE *P. roqueforti* PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (CLHP) -

Le choix de la chromatographie liquide est justifié par une polarité et un poids moléculaire élevés de nos composés rendant une chromatographie en phase vapeur délicate. D'autre part, la plupart des métabolites possèdent le chromophore cétone α, β insaturé qui présente un $\epsilon \approx 15000$ aux environs de 250 nm ; on peut donc envisager aisément une détection en absorption U.V. de ces composés.

Il faut obtenir une séparation suffisante pour pouvoir faire une mesure quantitative. La séparation en CCM de EA, PRT, EB avec élution par un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95/5, V/V) semblait satisfaisante. La transposition de ce solvant en CLHP s'est révélée inadéquate. Après divers essais, nous avons sélectionné deux éluants différents :

A - THF/Hexane (75/25, V/V) pour la séparation et le dosage de EA, PRT, EB

B - Chloroforme pour EC

La page ci-contre montre les chromatogrammes des quatre substances obtenus avec ces deux éluants. L'éluant A ne permet pas une estimation précise de EC par une mesure des hauteurs de pics. C'est dans ce but que l'éluant B a été utilisé.

La colonne utilisée est la même dans les deux cas et est un silice poreuse (taille moyenne des pores : 100 Å) de granulométrie 10 μm .

Nous avons testé la validité de cette méthode en mesurant :

- la stabilité des temps de rétention
- la reproductibilité des hauteurs de pics
- la sensibilité
- la linéarité de la réponse du détecteur

Nous avons réalisé des échantillons standards en mélange de EA, PRT et EB de 0,5 mg de chaque composé par ml de solution et une solution standard de EC à 0,5 mg/ml également (solution chloroformique).

Le volume injecté est constant (10 µl), les quantités variables sont obtenues par dilution adéquate des solutions mères.

a) Stabilité des temps de rétention :

Nous avons injecté sur deux jours, 26 échantillons du mélange EA, PRT, EB avec des quantités variant de 10 à 500 ng, et 30 échantillons de la solution standard EC (sur deux autres jours). Les résultats figurés dans le tableau suivant montre une grande stabilité des temps de rétention.

Composés	Temps de rétention (s)		Moyenne (minutes)	Ecart type (s)	Coefficient de variation %
	Gamme	Moyenne			
EA	291-295	294	4,9	1,1	0,37
PRT	443-449	447	7,4	1,5	0,33
EB	605-625	617	10,3	3,19	0,5
EC	395-414	406	6,7	5,2	1,3

b) La reproductibilité des hauteurs de pics :

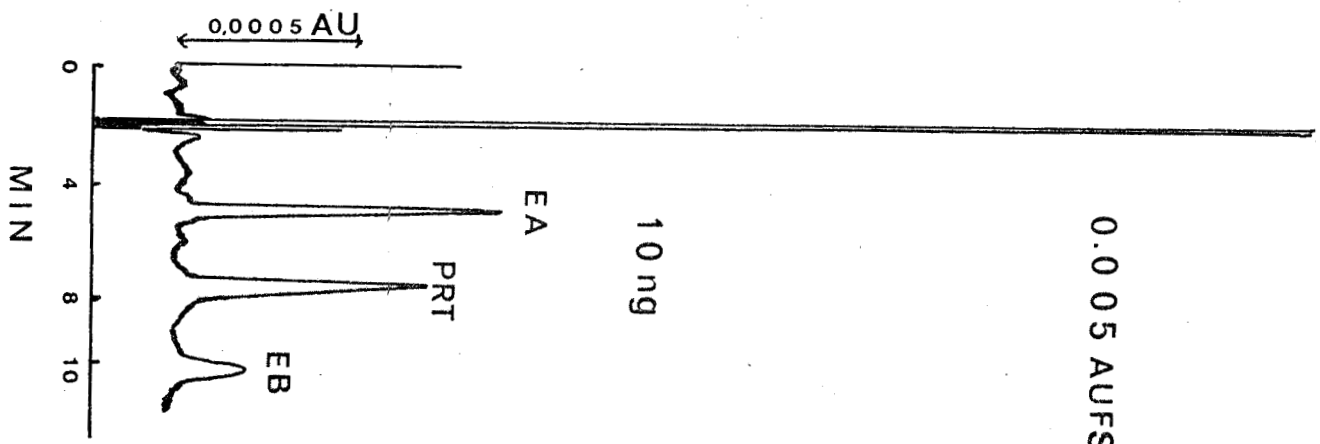
La reproductibilité des hauteurs de pics a été appréciée en injectant 10 fois 500 ng des échantillons (sur une journée). Les coefficients de variation obtenus de 0,8% à 2,8% représentent l'erreur totale résultant de l'injection, la résolution et de la détection

Composés	Hauteurs de pics (mm)		Ecart type (mm)	Coefficient de variation %
	Gamme	Moyenne		
EA	222-243	235	6	2,5
PRT	199-210	206	3,4	1,6
EB	67-74	71	1,9	2,8
EC	101-104	102	0,8	0,8

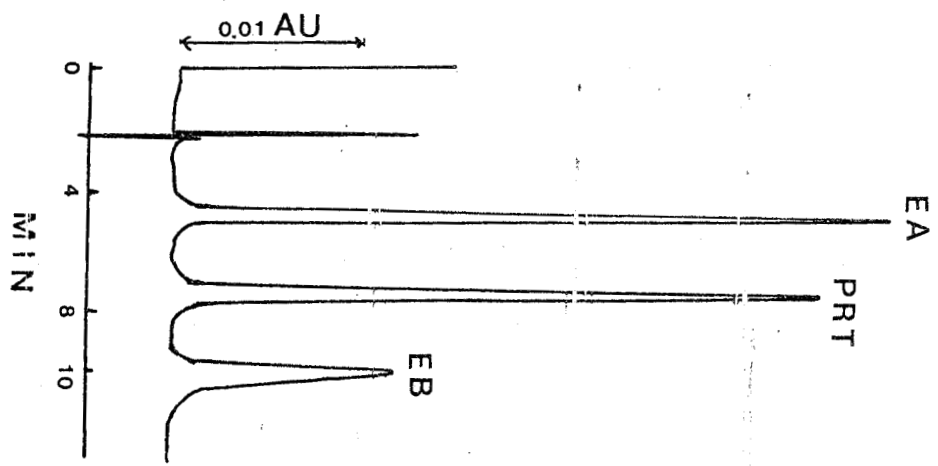
AUFS : Absorbance unit full scale



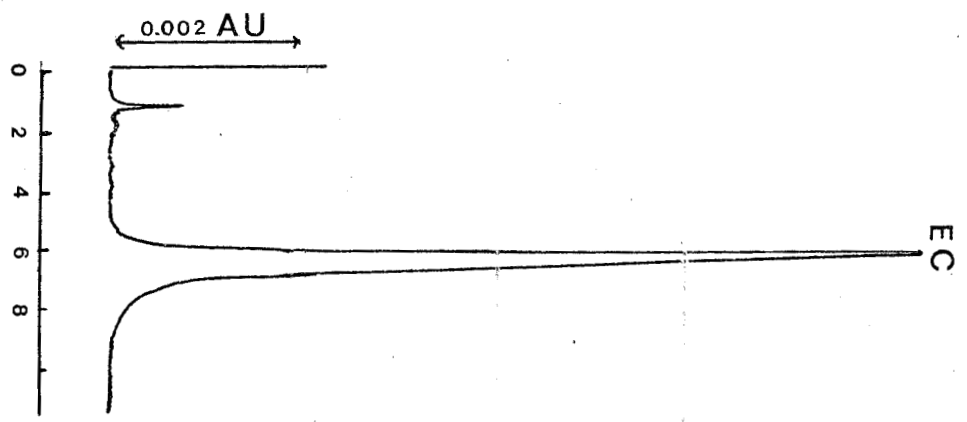
0.005 AUFS



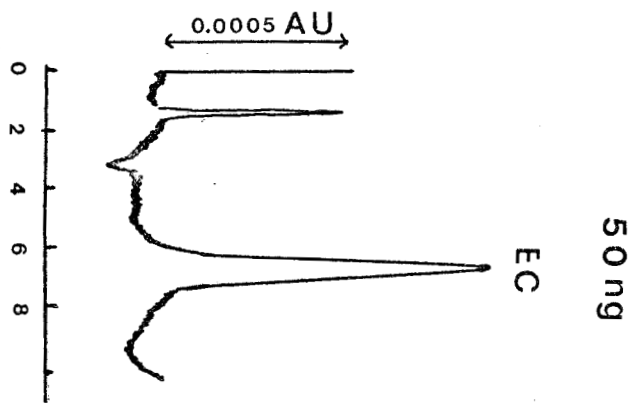
0.1 AUFS



0.02 AUFS

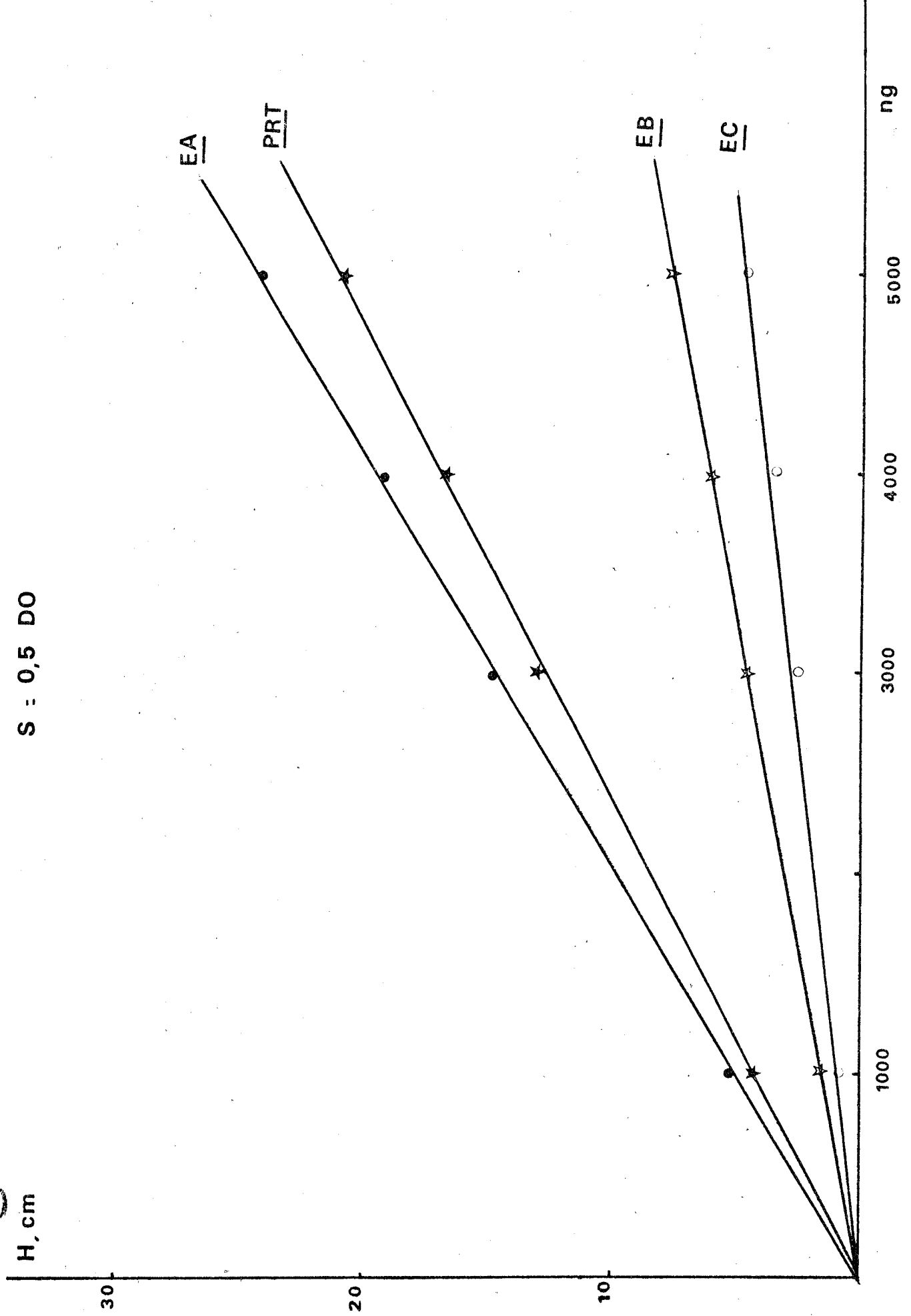


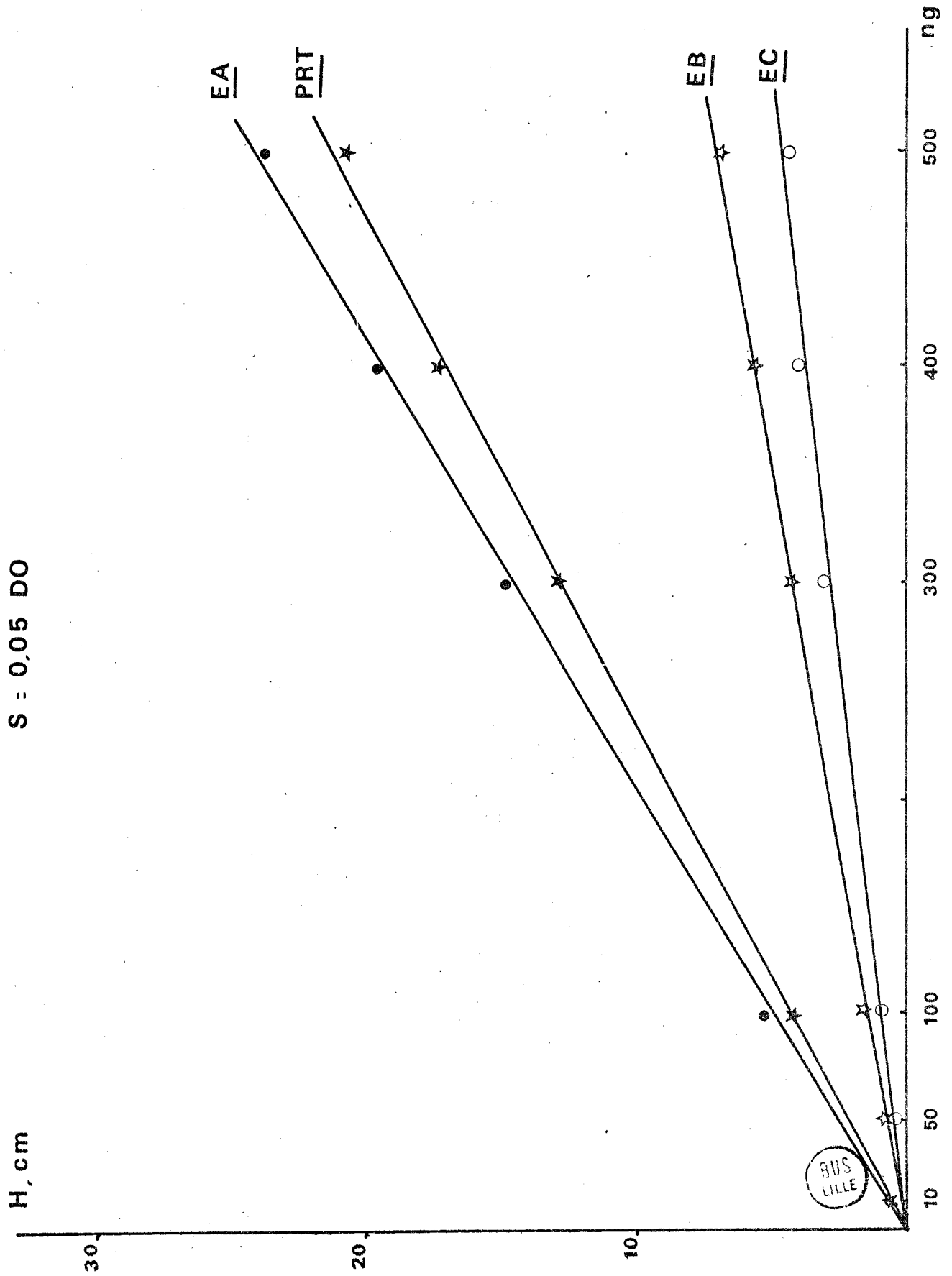
0.005 AUFS





S = 0,5 DO





c) La sensibilité de la méthode :

Cette sensibilité a été évaluée en injectant 50 ng des standards à la sensibilité maximum du détecteur (0,005 unités de Densité Optique sur la pleine échelle). Les hauteurs de pics (en mm) divisées par les quantités injectées (en nanogrammes) donne 4,7 (EA), 4,1 (PRT), 1,4 (EB), 0,95 (EC). Les chromatogrammes obtenus représentés ci-contre indiquent que l'on peut mesurer 10 ng de EA et PRT avec précision et 20 ng de EB et EC. Néanmoins on peut détecter 2 ng de EA et PRT et 10 ng de EB et EC.

d) La relation entre la hauteur des pics et les quantités injectées :

Cette relation a été obtenue en injectant 10 µl des échantillons standards sur une gamme allant de 10 à 5000 ng. Les graphiques ci-contre indiquent une bonne linéarité de la réponse dans la gamme envisagée.

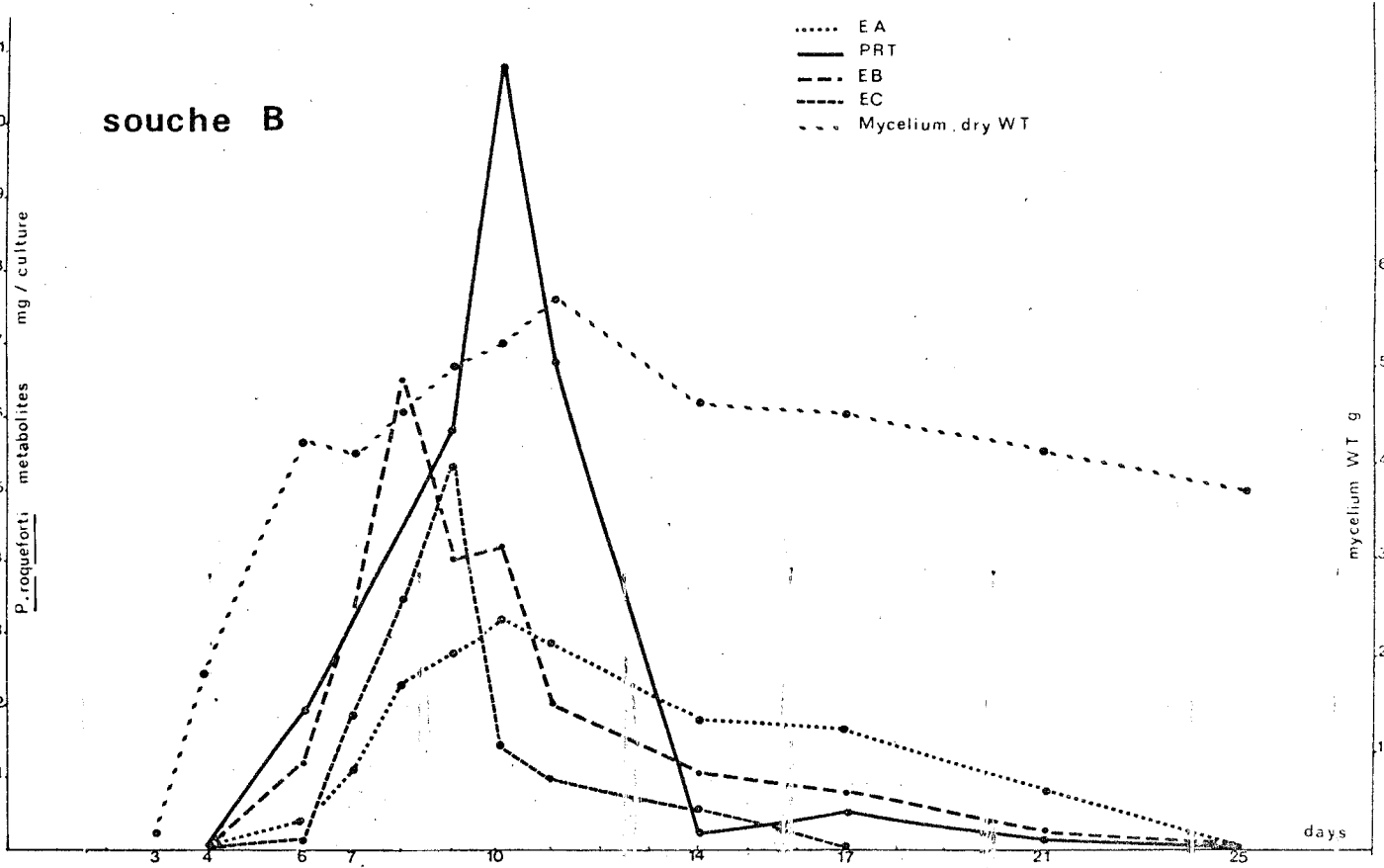
3° - CINETIQUE DE PRODUCTION DE EA, PRT, EB, EC -

Nous avons analysé le milieu de culture de la souche B qui élabore tous ces métabolites. Aux jours choisis nous avons prélevé trois fioles, rassemblé le milieu de ces trois fioles et extrait le milieu au chloroforme. Les trois mycéliums, soigneusement lavés à l'eau distillée, sont desséchés jusqu'à poids constants. La moyenne des trois poids secs est utilisé pour mesurer la croissance du champignon. Le pH du milieu de culture est pris juste avant extraction.

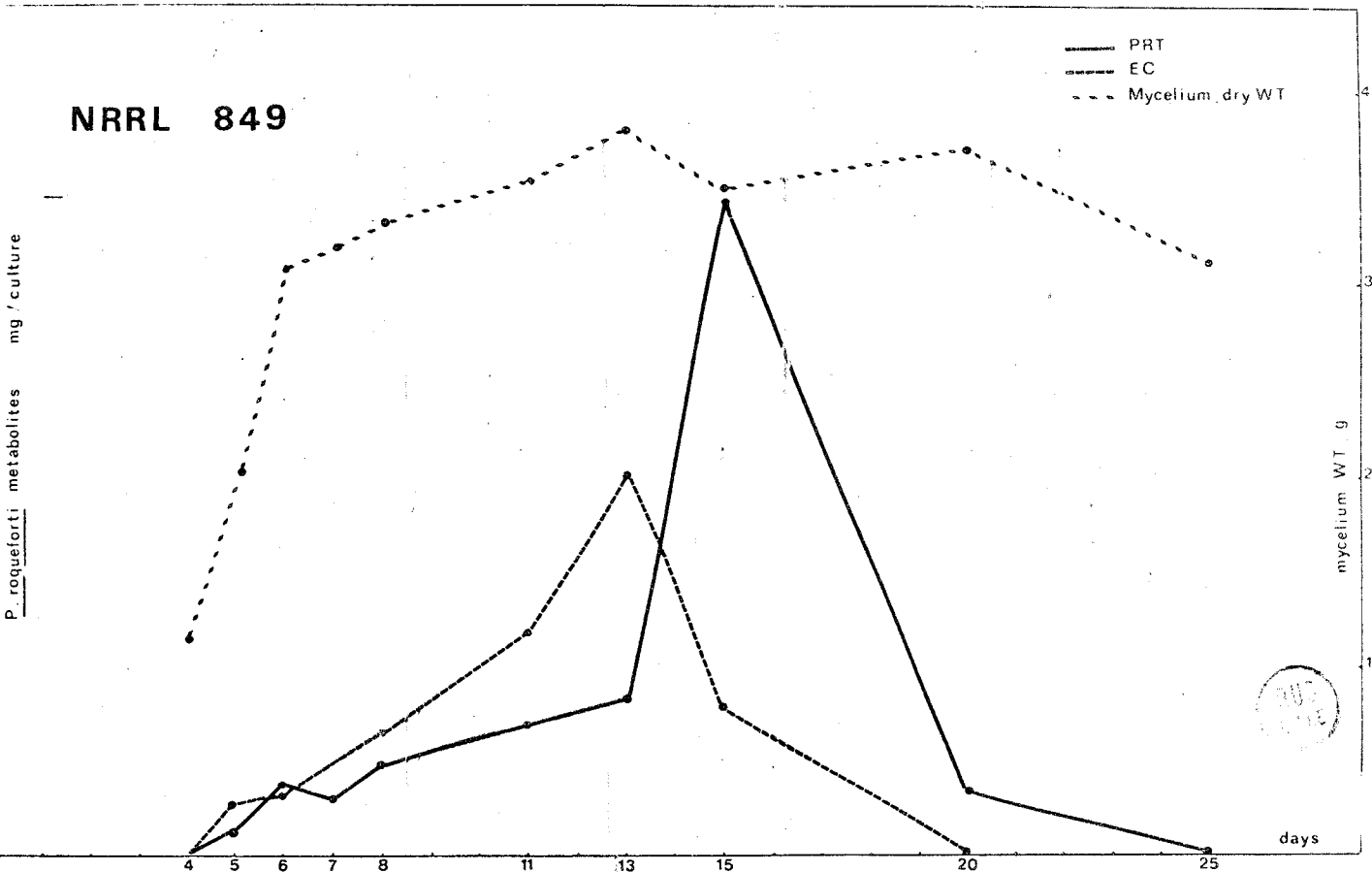
L'extrait chloroformique brut est d'abord purifié par une chromatographie sur une courte colonne de silice dont le but est de retenir les produits polaires qui pourraient encrasser la colonne LHP. L'extrait purifié est repris par du chloroforme et analysé par la colonne à haute performance.

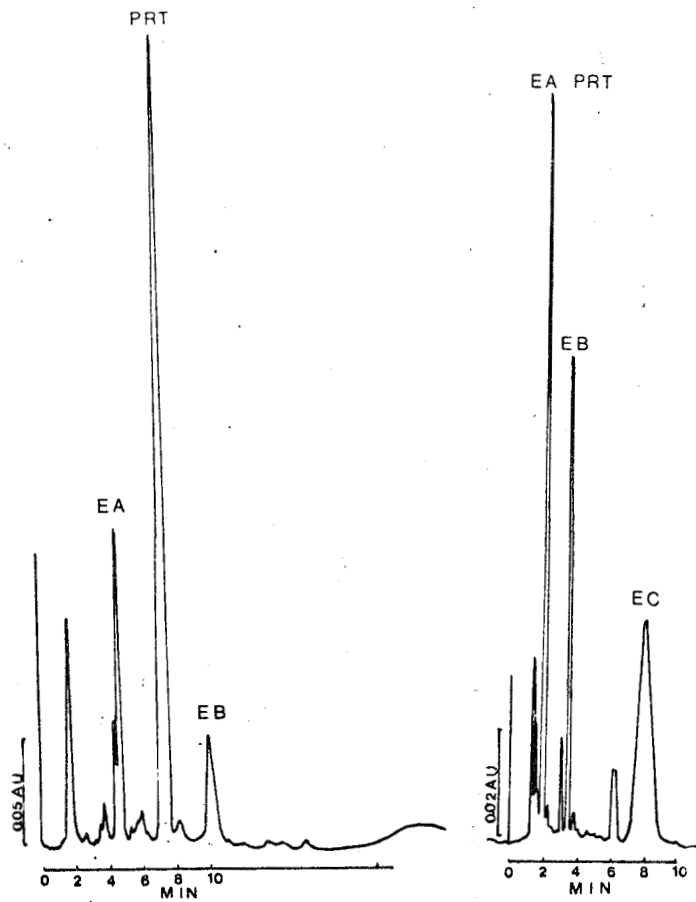
Le graphique ci-contre montre le résultat obtenu. Les quantités sont exprimées en mg de métabolites pour une culture (environ 150 ml de milieu). Le métabolite qui l'on obtient en quantité la plus importante est PRT dont le maximum se situe au 10ème jour à 11 mg par fiole. L'allure générale de production des métabolites ne permet pas de définir un ordre de biosynthèse entre ces métabolites. Il n'est pas possible de montrer que EB apparaît avant EA par exemple. Le seul caractère intéressant de ce diagramme est que l'augmentation rapide de la quantité de PRT du 10ème jour au 11ème jour est accompagné de la chute de la quantité de EC.

souche B



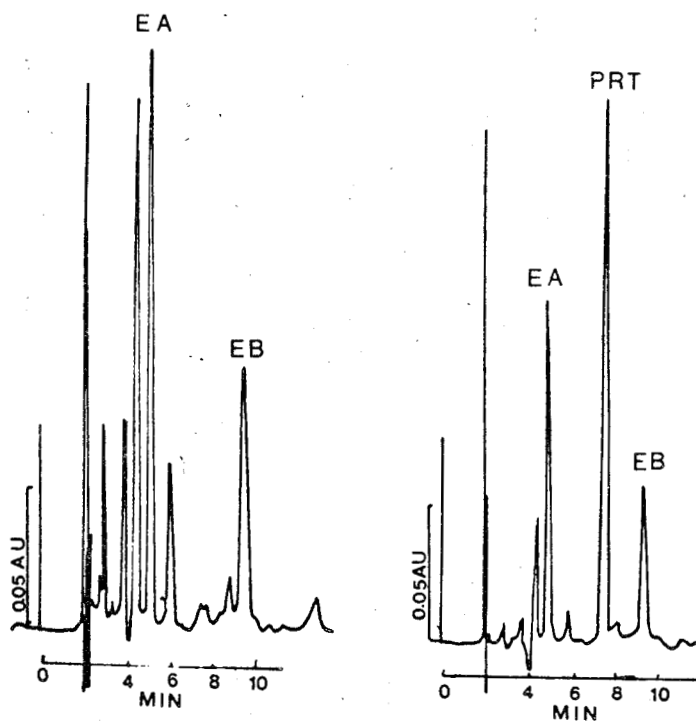
NRRL 849





mycelium

medium



Nous avons réalisé cette série de mesures trois fois. A chaque fois le seul fait intéressant était l'augmentation de la quantité de PRT, associée à la chute de EC. Seul au cours de ces différentes séries de mesures varie le jour du maximum de PRT observé (du 10ème au 14ème jour en général).

Pour vérifier le phénomène mis en évidence sur cette souche, nous avons répété ces mesures avec la souche NRRL 849 qui élabore seulement les composés EC, PRT, ED.

Le diagramme obtenu met en évidence le même phénomène que précédemment. Le maximum de EC se produit avant celui de PRT. Cette expérience répétée trois fois a conduit toujours au même profil.

Ces expériences indiquent que *in vivo* EC pourrait être le précurseur de PRT.

Nous avons cherché à analyser la teneur en ces divers métabolites du mycélium de ces souches. Nous avons extrait à des jours déterminés le milieu de culture et le mycélium de trois fioles. Dans tous les extraits réalisés sur le mycélium, il a été impossible par chromatographie liquide de retrouver la PR toxine, alors que le milieu de culture en contenait des quantités habituelles. Il en a été de même avec les extraits effectués sur la souche B ; le composé PRT n'est pas détectable dans le mycélium alors que les composés EA, EB, EC le sont mais en quantités beaucoup plus faibles que dans le milieu de culture (le dixième environ) (tableau ci-contre). L'analyse en CCM des divers extraits montre parfois une tache au Rf correspondant à PRT et dont la fluorescence est comparable mais très faible même avec des dépôts importants.

Nous avons incriminé l'instabilité de PRT au cours de l'extraction. En effet, P.M. SCOTT (54) a montré que la PR Toxine était instable dans des extraits contenant des acides aminés libres ou des amines.

Nous avons vérifié cette hypothèse en ajoutant juste avant extraction au mycélium d'une souche NRRL 849 des quantités raisonnables de PRT et EA (environ 1/10 de la quantité usuellement détectée dans le milieu de culture).

Métabolite ajouté	Quantité ajoutée en mg	Quantité retrouvée en %
EA	0,2	45%
	0,5	40%
PRT	0,2	15%
	0,5	11%

Ce tableau révèle donc l'instabilité des composés érémofortine et plus particulièrement de PRT dans un extrait chloroformique mycélien.

En conclusion de ce chapitre, nous pouvons dire que EC est très probablement le précurseur de PRT *in vivo*. Mais ceci n'est qu'une indication. Il est souhaitable de confirmer cette présomption par des arguments supplémentaires. D'autre part, nous n'avons aucune confirmation de l'hydroxylation du C-12 de EA conduisant à EC.

C'est pourquoi nous avons complété cette étude par des fractionnements cellulaires de *P. roqueforti* dans le but de mettre en évidence *in vitro* quelques étapes envisagées dans l'hypothèse.

III - ENZYMES DE P. roqueforti -

Parmi les réactions élémentaires, catalysées enzymatiquement, qui sont proposées dans le schéma de biosynthèse page , deux sont fréquentes :

- a) La réaction d'hydroxylation d'un méthyle
- b) La réaction d'oxydation d'un alcool.

Nous nous sommes efforcés d'objectiver la présence des enzymes responsables de ces deux réactions chez *P. roqueforti*.

1° - HYDROXYLATION DU METHYLE C-12 -

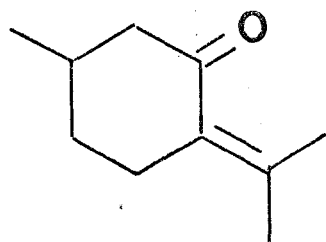
Cette réaction est un des modes d'actions d'un système enzymatique complexe que l'on nomme oxydase à fonction mixte localisée sur le réticulum endoplasmique des cellules Eucaryotes. Nous détaillons le fonctionnement d'un tel système dans le paragraphe consacré à la métabolisation de PRT et EA par des enzymes hépatiques. Ces oxydases interviennent dans le métabolisme de substances endogènes tels que le cholestérol, l'ergostérol (principal stérol des champignons) les acides gras. Elles sont remarquables par leur faible spécificité, c'est-à-dire par leur capacité à métaboliser une très grande variété structurale de substrats. Elles sont aussi inductibles, c'est-à-dire qu'elles sont induites par les substances qu'elles métabolisent.

Elles donnent lieu le plus souvent à des réactions d'époxydation (sur des doubles liaisons) ou d'hydroxylation sur des groupes méthyles ou méthylènes, des réactions de déalkylation (56).

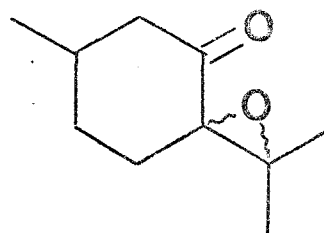
Nous avons recherché la présence d'une hydroxylase EA → EC chez *P. roqueforti*. Nous avons pour cela fractionné la cellule par broyage, puis centrifugation. Le système microsomal porteur des oxydases à fonctions multiples est obtenu par une centrifugation de 105.000 g pendant 1,5 heure d'un surnageant Post mitochondrial. Le culot obtenu constitue les microsomes, le surnageant est le cytosol.

L'incubation du culot à 105.000 g en présence de NADPH^H, d'oxygène, avec EA n'a jamais permis la mise en évidence *in vitro* de la réaction recherchée.

Nous avons alors tenté de la mettre en évidence *in vivo* chez *P. roqueforti* : nous avons ajouté, dans le milieu de culture de *P. roqueforti* (au 7^{ème} jour, moment d'apparition de EC) divers composés de structure pouvant servir de support à une réaction d'hydroxylation du type EA-EC. La pugénone et son époxyde furent choisis dans cette intention.



(+) Pulégone

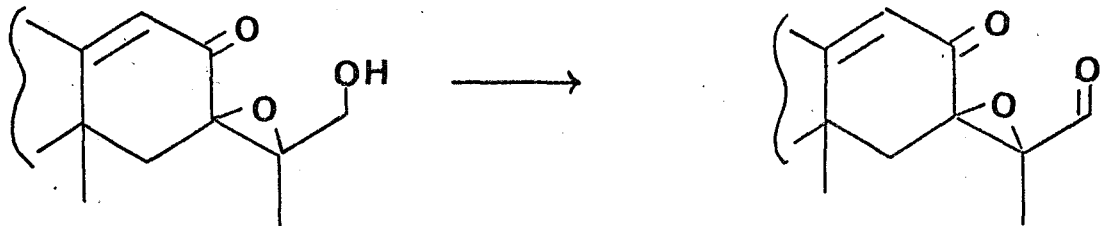


époxydes de la Pulégone

Aucun composé présentant un hydroxyle sur l'un des méthyles 9, 10 ne pu être isolé. A côté du composé de départ resté très majoritaire, même après 7 jours d'incubation, seuls des produits de réduction de la fonction cétone furent obtenus (la mise en évidence de ces composés a été réalisée uniquement par spectroscopie I.R. et R.M.N.).

2° - REACTION D'OXYDATION DE L'HYDROXYLE EN 12 -

Cette réaction de déshydrogénation d'un alcool est classiquement effectuée par un enzyme du type alcool déshydrogénase :



Nous avons entrepris la mise en évidence d'une activité de ce type, c'est-à-dire de l'interconversion EC → PRT dans la cellule de *P. roqueforti*. Pour cela nous avons incubé le cytosol et la fraction microsomale de cellules de *P. roqueforti* avec EC.

L'incubation type réalisée est la suivante : à 0,1 mg de protéines (cytosoliques ou microsomales) en suspension dans un tampon phosphate (pH = 7) on ajoute 0,6 μmole de EC. Après une heure de contact à 20°C, on extrait l'incubât au chloroforme. Cet extrait est analysé par CCM pour suivre la formation éventuelle de métabolites.

Les incubations sont réalisées à partir du fractionnement de deux souches de *P. roqueforti* cultivées pendant 14 jours. La souche NRRL 849 et une souche B-15 (non productrice de PRT). Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Incubat	Souches NRRL 849		B-15	
	Cytosol	microsomes	Cytosol	microsomes
Métabolites { PRT	+	-	-	-
obtenus { autres	-	-	-	-

Nous constatons immédiatement que seul le cytosol de la souche NRRL 849 permet d'obtenir une métabolisation de EC en PRT et qu'il n'y a pratiquement pas d'autres métabolites détectables en CCM. La souche B-15 non productrice de PRT est incapable d'effectuer cette transformation. En multipliant par dix les quantités de protéines cytosoliques de B-15, nous n'avons pu mettre en évidence la présence de PRT par CCM.

Nous avons ensuite surtout cherché à préciser l'aspect qualitatif de cette activité. En premier lieu nous avons vérifié qu'un cytosol actif était complètement inactivé par un traitement de 15 minutes à 100°C. Dans un deuxième temps nous avons voulu vérifier la réversibilité de la réaction observée, c'est-à-dire savoir si ce cytosol était capable d'effectuer la réaction inverse PRT → EC en présence d'un réducteur enzymatique classique, le NADPH ou le NADH.

L'incubation de PRT en présence de NADPH ou de NADH pendant une heure ne conduit pas à l'obtention de EC comme l'indique l'analyse en CCM.

Dans des conditions analogues, lors de l'étude de la métabolisation hépatique de PRT, nous avons montré que le cytosol de l'hépatocyte réduisait PRT en EC en présence de NADPH. (Voir chapitre Toxicité).

Il semble donc que les études *in vivo* et *in vitro* aboutissent aux mêmes conclusions. Le champignon est capable d'effectuer la synthèse de PRT à partir de EC. Il n'est pas dans l'état actuel des travaux possible de déterminer si cette réaction est catalysée par un alcool déshydrogénase classique, mais il est important de noter que seule une souche productrice de PRT présente cette activité.

D'autre part, nous avons tenté de réaliser l'interconversion EC → PRT par une ADH de levure. Cette transformation s'est révélée également impossible. Un ADH de levure est trop spécifique pour accepter un substrat tel que EC.

Ceci nous incite à penser que l'enzyme responsable de la déshydrogénation EC → PRT est spécifique de *P. roqueforti*.

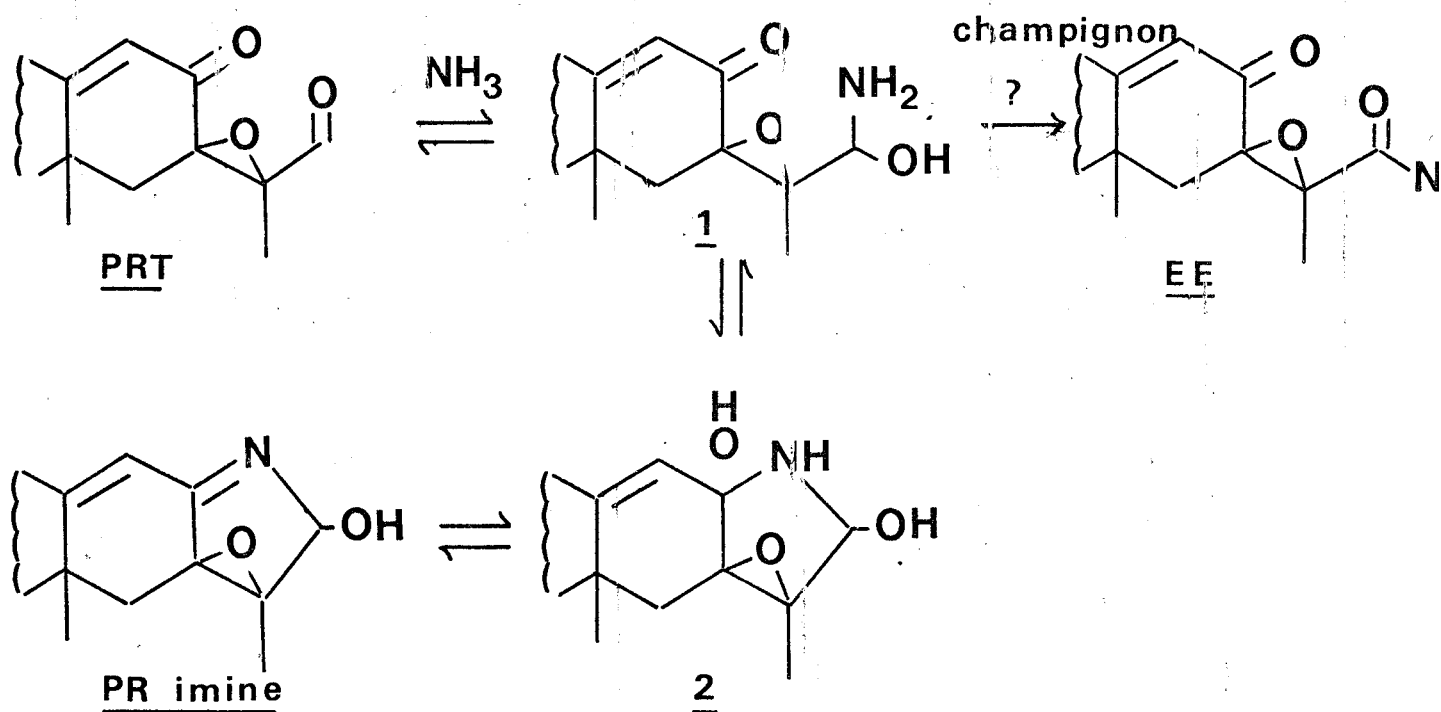
Il s'agit certainement d'un enzyme génétiquement codé spécifique des souches toxigènes de *P. roqueforti*.

IV - BIOSYNTHESE DE EE ET PR IMINE -

Ces deux métabolites azotés ont été isolés lors d'une culture de la souche NRRL 849. Nous n'avons jamais pu obtenir à nouveau ces métabolites simultanément.

Nous proposons ici une hypothèse pour rendre compte de leur présence simultanée au cours d'une culture.

La réaction chimique de l'ammoniaque sur PRT conduit au composé nommé PR imine. Le mécanisme d'une telle réaction fait intervenir les intermédiaires classiques suivants :



EE pourrait être considéré comme provenant de la réaction d'oxydation de la carbinolamine intermédiaire 1.

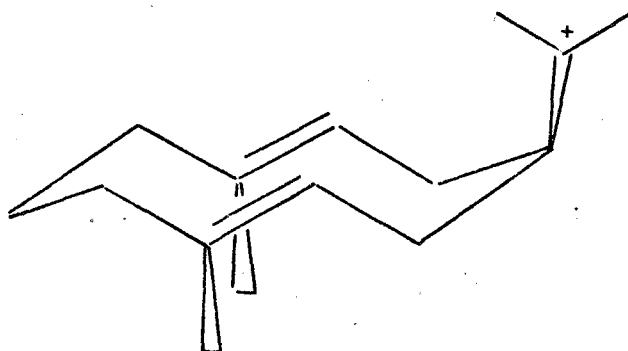
Pour vérifier cette hypothèse, nous avons ajouté dans le milieu de culture de *P. roqueforti* du sulfate d'ammonium, soit dès le début de la culture, soit en cours de culture. Dans chaque expérience, seule la PR imine fut synthétisée.

Nous avons tenté de faire agir, sur ce système, la fraction contenant l'ADH de *P. roqueforti*. L'incubation de PRT, sulfate d'ammonium, et ADH n'a jamais permis la mise en évidence de EE.

Néanmoins, le problème de la présence de ces deux métabolites dans une culture se pose. Il est possible qu'au cours d'une stérilisation à l'autoclave du milieu de culture, une élévation de température entraîne une destruction partielle du milieu et apparition d'ion ammonium (à partir de l'extrait de levure source d'azote complexe), responsable de la formation de PR imine et EE.

C O N C L U S I O N

Le schéma de biosynthèse des métabolites de *P. roqueforti* n'a pas été confirmé dans tous ces aspects. Le composé EB est probablement le premier des métabolites élaborés. Sa stéréochimie absolue déterminée permet de postuler que la conformation du cation 6, qui a donné naissance au squelette eudesmane précurseur, est la suivante :



Ce cation conduit par cyclisation, puis réarrangement, au squelette érémosphilane épimère en 7 (7 α).

L'étude biosynthétique du ^{13}C montre que ce réarrangement est bien une migration du méthyle en 15.

L'étape la mieux établie dans cette biosynthèse est l'interconversion EC \rightarrow PRT où nous avons pu montrer que *in vivo* et *in vitro*, la transformation EC \rightarrow PRT était réalisable et que cette transformation était spécifique des souches toxigènes de *P. roqueforti*.

ACTIVITES BIOLOGIQUES DE PRI

--0000000--

T O X I C I T É D E PRT

R.D. WEI, dans son étude préliminaire de PRT (2) a mentionné sa toxicité chez le rat. Il a mesuré une dose létale 50 (DL 50) de 11 mg/Kg et 115 mg/Kg par voie intrapéritoniale et orale respectivement. Des valeurs un peu inférieures ont été trouvées au cours de nos propres expériences.

Dans un test de toxicité, utilisant un protozoaire cilié : *colpidium campylum*, effectué en collaboration avec D. DIVE et développé dans la publication jointe (Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1978), nous avons mesuré l'inhibition de la multiplication cellulaire de ce protozoaire par PRT. La dose minimale active (D.M.A.) est la dose minimale qui modifie la croissance de la culture. On obtient pour PRT une D.M.A. de 0,25 µg/ml. Dans ce test l'aflatoxine B ne répond pas à des doses de 10 µg/ml, mais la patuline et le diacétoxysciapénol montrent une D.M.A. de 0,5 µg/ml.

ALTÉRATIONS MÉTABOLIQUES

INDUITES PAR PRT

PRT altère le métabolisme cellulaire au niveau de ses mécanismes essentiels, c'est-à-dire ceux qui sont liés à la transmission de l'information biologique. Cette information est stockée dans le DNA au niveau de la séquence des bases de ce DNA. La replication assure la formation de copies exactes du DNA pour la transmission héréditaire de l'information. Dans le processus de transcription, l'information génétique est transférée du DNA aux différents RNA dont les RNA m. Enfin, l'information génétique du RNA messenger est utilisée pour la synthèse des protéines au cours d'un processus appelé traduction.

Nous allons examiner l'action de PRT à ces différents niveaux et nous rappellerons rapidement à cette occasion le fonctionnement de ces étapes de transmission de l'information.

I - ACTION SUR LA REPLICATION -

Il est bien connu que le DNA porte dans la séquence de ses nucléotides l'information génétique du "code". La replication est le processus par lequel le DNA se duplique en respectant ce code. La biosynthèse du DNA par les DNA polymérases à partir des nucléotides triphosphates, en utilisant comme modèle une molécule de DNA constitue ce processus.

C. AUJARD a montré que PRT inhibe la biosynthèse du DNA sur des cellules hépatiques en cultures (65). De plus, cette inhibition s'est avérée irréversible, c'est-à-dire qu'il y a persistance du phénomène après élimination de PRT du milieu d'incubation.

II - ACTION SUR LA TRANSCRIPTION -

La transcription désigne le processus biochimique de la biosynthèse du RNA chez la cellule eucaryote, la transcription a lieu dans le noyau. La biosynthèse du R.N.A. est effectuée par des RNA polymérases DNA dépendantes à partir de nucléotides triphosphates en utilisant comme modèle le brin du DNA qui détient l'information. On distingue globalement trois étapes :

- l'initiation (mise en place des facteurs nécessaires à la synthèse du RNA),
- l'élongation (synthèse de la chaîne RNA),
- la terminaison (séparation du RNA synthétisé et du complexe DNA , RNA polymérase).

Y. MOULÉ a montré que le processus transcriptionnel est inhibé par PRT (66) en utilisant un test *in vitro* fonctionnant avec les noyaux isolés de foie.

En utilisant un système *in vitro* comprenant comme modèle du DNA de thymus de veau et comme enzyme la RNA polymérase de *E. coli*, cet auteur montre en outre que l'inhibition se fait au niveau de la RNA polymérase et que les étapes d'initiation et d'élongation sont inhibées. Enfin, PRT est actif sur la transcription sans métabolisation préalable.

III - ACTION SUR LA TRADUCTION -

La traduction est le processus biochimique de la biosynthèse des protéines. La biosynthèse des protéines se produit sur les polysomes (ribosomes alignés sur le RNA m). Le code du RNA m est traduit en une séquence peptidique ; ce processus exige la présence de la fraction pH 5 enzyme ainsi que celle de beaucoup d'autres facteurs protéiques (facteurs d'initiation, d'élongation, de terminaison).

La fraction pH 5 enzyme apporte les enzymes indispensables à la traduction (aminoacyl t RNA synthétases et les différents RNA de transfert). Comme la transcription, la traduction se déroule en plusieurs étapes : initiation élongation et terminaison.

Y. MOULÉ a montré que PRT inhibe la traduction *in vivo* dans le foie des rats (67). A l'aide d'un test *in vitro* reconstituant à partir de fractions de foies de rats (polysomes et pH 5 enzymes), Y. MOULÉ a montré que l'inhibition est retrouvée *in vitro* et que l'inhibition serait essentiellement due à l'altération de la fraction pH 5 enzyme.

D É T E R M I N A T I O N D E S G R O U P E S A C T I F S D E PRT, E T U D E S T R U C T U R E S A C T I V I T E S

L'existence à côté de PRT de métabolites présentant des différences structurales mineures et précises permet d'envisager une étude des relations entre la structure chimique et l'activité biologique. C'est ainsi que nous avons testé l'activité biologique de nos composés EA, EB, EC, du dérivé 3 hydroxy de PRT 7 et enfin PR imine (voir figure ci-contre).

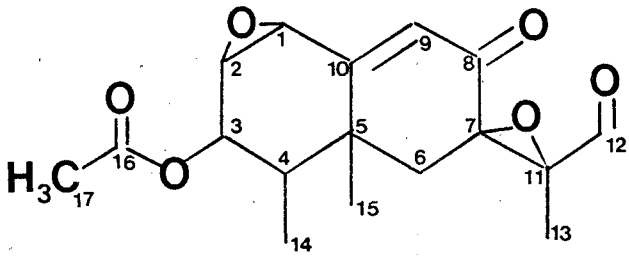
Nous avons testé l'action des composés mentionnés vis-à-vis de trois systèmes :

- Toxicité *in vivo* sur souris.
- Inhibition de la transcription *in vitro*
- Inhibition de la traduction *in vitro*

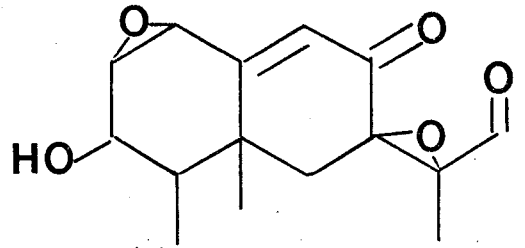
Les mesures ont été effectuées au laboratoire de Y. MOULÉ. Les conditions expérimentales exactes des tests utilisés sont précisées dans la publication jointe (Chem. Biol. Interactions, 1977).

La transcription *in vitro* est réalisée avec des noyaux isolés de foie de rats, en présence de nucléotides marqués (^{14}C). On compare l'incorporation dans le noyau des précurseurs, dans le système en présence ou en l'absence des métabolites à tester. On mesure donc un pourcentage de l'activité de synthèse par rapport au témoin.

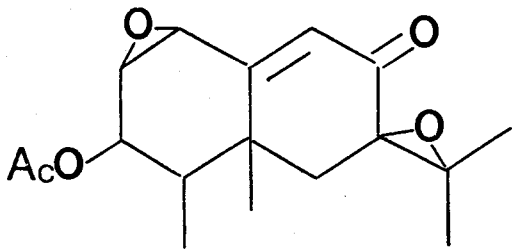
La traduction *in vitro* est réalisée à partir de polysomes, en présence de leucine marquée (^{14}C). On mesure l'incorporation du précurseur marqué dans les protéines. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité du témoin.



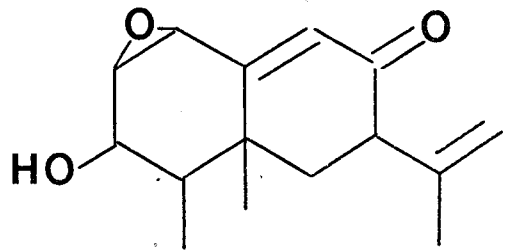
PRT



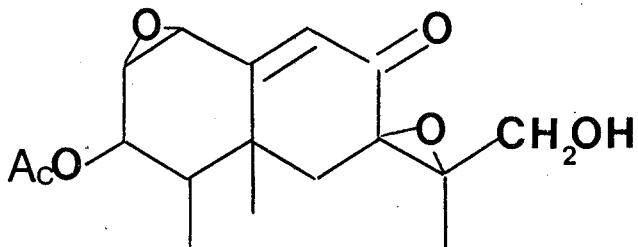
7



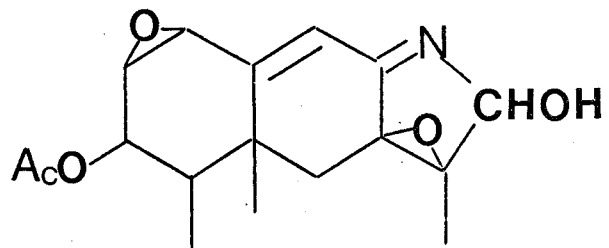
EA



EB



EC



PR imine



Le tableau suivant résume les résultats obtenus sur la toxicité *in vivo*, la transcription et la traduction :

Métabolites	Toxicité sur souris		Transcription		Traduction	
	mg/Kg	Mortalité	µg/ml	% inhi.	µg/ml	% inhi.
EA	15	0/6	800	16	1000	9
PRT	10	15/5	40	66	200	68
EB	15	0/3	800	11	500	4
EC	50	0/5	800	5	2000	11
7	10	4/4	40	62	200	63
PR imine	15	0/4	800	17	1000	10

PRT et 7 sont les seules molécules biologiquement actives. De plus, il y a une bonne corrélation entre les réponses données par les essais de toxicité *in vivo* et celles obtenues sur les tests *in vitro*. Ceci suggère que le pouvoir toxique et l'aptitude à inhiber les étapes de transcription et de traduction *in vitro* sont gouvernées par une même structure chimique. Il est clair que la fonction aldéhyde en 12 est directement impliquée dans l'activité biologique des composés testés. La perte de ce groupement fonctionnel détermine l'inactivité totale des molécules (EA, EB, EC et PR imine).

Par ailleurs, il faut remarquer que les deux fonctions époxydes présentes sur la plupart des composés étudiés ne jouent apparemment aucun rôle déterminant dans l'activité biologique mesurée.

Ces relations entre structures chimiques et activités biologiques ont été retrouvées dans les tests de toxicité sur *Colpidium campylum*. Les doses minimales actives ont été mesurées jusqu'à la concentration de 10 µg/ml.

Métabolites	D.M.A. (µg/ml)
PRT	0,25
EA	> 10
EB	> 10
EC	> 10
ED	> 10

RELATIONSHIPS BETWEEN THE CHEMICAL STRUCTURE AND THE
BIOLOGICAL PROPERTIES OF SOME EREMOPHILANE
COMPOUNDS RELATED TO PR TOXIN

Y. MOULÉ, S. MOREAU and J.F. BOUSQUET

*Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer F94800 Villejuif, Unité INSERM U42,
F59650 Villeneuve d'Ascq, and Station de Pathologie Végétale de
l'INRA, F78000 Versailles (France)*

(Received December 13th, 1976)

(Accepted February 5th, 1977)

SUMMARY

The problem of the chemical structure—biological effects relationships has been studied for various eremophilane compounds related to PR toxin (PRT), a mycotoxin synthesized by *Penicillium roqueforti*. The biological tests were based on in vivo toxicity for male Swiss mice and inhibition of in vitro transcription and translation. The results showed a good correlation between the responses obtained for the three tests by the different compounds; thus, the toxic potency and the capacity of inhibiting transcription and translation should be directed by a common chemical structure. The data also indicated that the biological properties are related to the existence of an aldehyde group in position 12. In addition, evidence has been obtained demonstrating the hydrolysis of PRT imine with formation of a PRT-like compound.

INTRODUCTION

PRT, a mycotoxin synthesized by some strains of *Penicillium roqueforti*, produces acute toxic effects in various animal species [1,2]. The LD₅₀ for male rats and mice is about 7 mg/kg by intraperitoneal injection. PRT also, induces biochemical alterations in rat liver, i.e., inhibition of protein and RNA syntheses [3,4].

From a chemical point of view, PRT derives from the eremophilane ring system [5] (Fig. 1). Apart from PRT, the cultures of *P. roqueforti* contain other metabolites having the same basic structure but with various definite

Abbreviations: DMSO, dimethylsulfoxide; PRT, PR toxin.

186

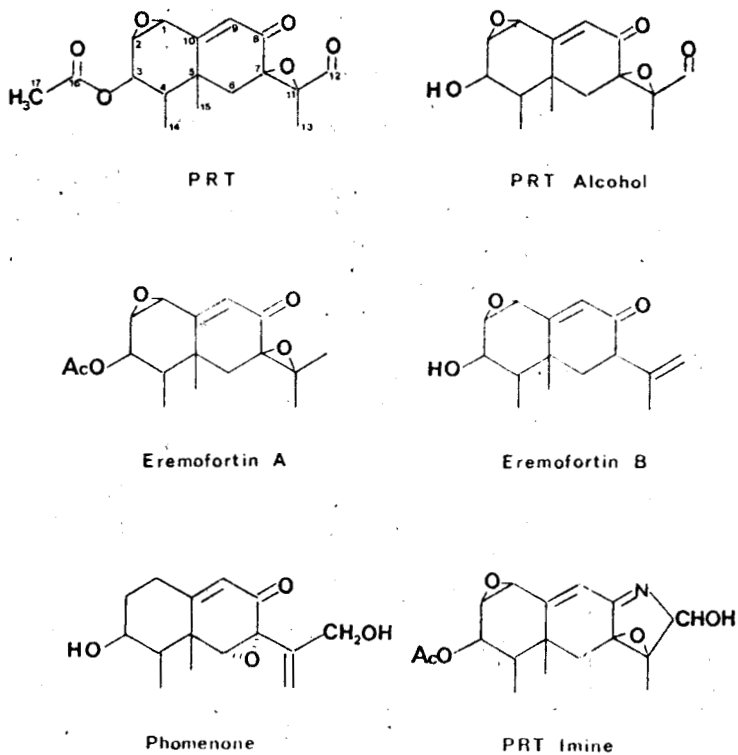


Fig. 1: The structures of the various compounds tested.

chemical modifications [5,6] (Fig. 1). A similar structure is also found in phomenone, a mycotoxin isolated from cultures of *Phoma exigua* var. *inoxydabilis* [7,8].

The present paper constitutes an approach to the problem of the chemical structure—biological effects relationships of these related compounds. The results demonstrate the utmost importance of the aldehyde group for the existence of biological activities.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of mycotoxins

A PRT-producing strain of *Penicillium roqueforti*, originally isolated from cheese, was grown in medium used by Wei et al. [2]. PR toxin and eremofortin A and B were isolated according to a procedure previously described [6]. PRT alcohol and PRT imine were chemically synthesized from PR toxin as described by Wei et al. [5]. Phomenone was isolated from cultures of *Phoma exigua* var. *inoxydabilis* and purified according to the technique of Bousquet [7].

Animals

Adult male Swiss mice weighing $30 \text{ g} \pm 3 \text{ g}$ were used for determination of the *in vivo* toxicity. They were given intraperitoneal injections of mycotoxins dissolved in (DMSO). Control mice received the vehicle alone.

Adult male Wistar rats (Commentry strain) were used for isolation of liver nuclei and preparation of liver polysomes. They were fasted 15 h before decapitation. The livers were quickly removed and chilled at 0°C .

Isolation of nuclei

Livers were homogenized in 9 vol of 2.2 M sucrose ($d = 1.28$) containing 1 mM Mg^{2+} . The homogenate was centrifuged for 80 min at 19 000 rpm (Beckman J 21, rotor JA 20) according to Chauveau et al. [9]. The pellets of nuclei were usually kept at -30°C without enzymatic inactivation before being tested.

Isolation of polysomes

A liver homogenate was prepared in 4 vol. of 0.25 M sucrose made in medium B (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM KCl, 5 mM Mg $(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 40 mM NaCl) and RNAase inhibitor (9 : 1). The soluble RNAase inhibitor from liver was prepared according to Blobel and Potter [10] and used in each step of cell fractionation. The homogenate was filtered through four layers of surgical gauze and centrifuged for 10 min at 15 000 rpm (Beckman J 21, rotor JA 20).

The postmitochondrial supernatant was carefully removed and adjusted to a final concentration of 1.35% in sodium deoxycholate. Total polysomes were obtained by a previously described modification [11] of the original Blobel and Potter procedure [10] using a discontinuous density sucrose gradient. The gradients were centrifuged for 16 h at 30 000 rpm (Spinco, rotor 30). The supernatant layers were discarded. The pellet were kept at -30°C before use.

RNA polymerase system

The determination of the RNA polymerase activity of isolated nuclei was carried out as follows: pellets of nuclei were resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 7.8 (1.6 ml per pellet of nuclei isolated from 5 g of liver). The standard system contained in 0.26 ml: 40 μmoles Tris-HCl, pH 7.9, 2 μmoles MgCl_2 , 0.25 μmole each of three unlabelled nucleoside-5'-triphosphates and 0.25 μmole of a ^{14}C -labelled nucleoside-5'-triphosphate corresponding to 0.1 μCi (NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain, West Germany), 10 μl of DMSO or 10 μl of DMSO containing the compound to be tested, 0.2 ml of a suspension of nuclei (unless otherwise stated). The incubations were run in duplicate for 10 min at 37°C , and the samples were processed according to the procedure previously described [12].

Amino acid incorporating system

The determination of the *in vitro* amino acid incorporating activity by

liver polysomes was carried out as follows: pellets of polysomes were resuspended in medium B. The standard system contained in 0.51 ml: 0.25 μ moles ATP, 0.05 μ mole GTP, 1.5 μ moles phosphoenolpyruvate, 12.5 μ g pyruvate kinase, 25 μ moles Tris-HCl, pH 7.5, 5 μ moles Mg (CH₃COO)₂, 50 μ moles KCl, 20 μ moles NaCl, 0.025 μ mole of each of the 19 unlabelled amino acids, 1 μ Ci L-[U-¹⁴C]leucine (230 mCi/mmole), about 2 mg of the pH 5 enzyme fraction prepared according to Wettstein and Noll [13], 10 μ l of DMSO or 10 μ l of DMSO containing the compound to be tested, and 0.150 ml of a suspension of polysomes corresponding to about 5 A₂₆₀ units. After incubation at 37°C for 45 min, three 100 μ l samples were pipetted on Whatman 3 MM filter paper discs. Radioactivity of the incorporated labelled leucine was measured according to Mans and Novelli [14].

The radioactivity was counted in a liquid scintillation spectrometer (Intertechnique, Paris, France).

RESULTS AND DISCUSSION

In vivo experiments have shown that PRT induces short-term alterations in liver metabolism by impairing RNA and protein syntheses as early as 1 h after drug administration (3, 4 and unpublished results). In vitro, the addition of PRT produced an inhibition of both transcription carried out by nuclei and translation promoted by polysomes. The inhibitory action did not require an enzymatic conversion of PRT prior to interfering with biosynthetic processes [4]. Moreover, incubation of PRT with liver microsomes with or without added NADPH failed to increase the inhibitory effects on in vitro systems. These findings demonstrated that PRT is the molecule directly active on cell metabolism.

The results obtained with PR toxin-derived compounds show that large variations in the biological activity are observed among the tested compounds (Table I); PRT and PRT alcohol are the only molecules biologically active. However, there is a good correlation between the responses for in vivo toxicity and that obtained for in vitro effects on cell-free systems for the various metabolites derived from *Penicillium roqueforti*. Phomenone isolated from *Phoma exigua* has no toxicity and no effect on in vitro RNA synthesis but significantly inhibits the in vitro activity of polysomes. This fact requires further investigations which are now in progress.

The foregoing results support the view that the toxic potency and the capacity of inhibiting transcription and translation are directed by a common chemical structure. They also clearly demonstrate that the aldehyde group on position 12 is directly implicated in the biological activity of the tested compounds. The loss of this functional group determines the inactivation of the molecules (eremofortin A, B, PRT imine and phomenone).

In addition, the present data suggest that the two epoxide radicals do not play an important role since their presence (eremofortin A, B and PRT imine) is not accompanied by a significant biological activity. The obtention of a derivative having the aldehyde function, but missing the epoxide groups,

TABLE I

TOXICITY AND EFFECTS OF SOME EREMOPHILANE ON IN VITRO TRANSCRIPTION AND TRANSLATION

The various metabolites were dissolved in DMSO and injected intraperitoneally into male Swiss mice. The composition of the standard assays is described in MATERIALS and METHODS. The transcription reaction was started by the addition of 0.2 ml of a suspension of isolated liver nuclei which were added immediately after the metabolite to be tested. The translation reaction was started by the addition of 0.15 ml of a suspension of isolated liver polysomes which were added immediately after the metabolite to be tested. The percentage of inhibition was calculated on the basis of a control system containing DMSO alone. The experiments were repeated at least 3 times and the results of a typical series are reported in the table.

Metabolites tested	Toxicity on mice		Action on in vitro transcription		Action on in vitro transcription	
	mg/kg	mortality at 30 days	µg/ml	% inhibition	µg/ml	% inhibition
<i>P. roqueforti</i> cultures						
PR toxin	10	15/15 ^a	40	66	200	68
			20	48	100	40
Eremofortin A	15	0/ 6	800	16	1000	9
Eremofortin B	15	0/ 3	800	11	500	4
PRT alcohol	10	4/ 4 ^a	40	62	200	63
PRT imine	15	0/ 4	800	17	1000	10
<i>P. exigua</i> cultures						
Phomenone	20	0/ 4	400	14	500	40

^a The animals died within 40 h.

would definitively confirm this conclusion. Moreover, the comparison of the chemical structure of the two equally toxic compounds, PRT and PRT alcohol (Table I and Fig. 1) led to the conclusion that acetylation of the eremophilane ring is not connected with the toxic property.

It should be pointed out that preincubation of the various metabolites at 37°C in the presence of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, before the assays did not modify the aforementioned responses, except for PRT imine (Table II). This activation did not correspond to an enzymatic conversion of the molecule since the preincubation carried out in the absence of isolated nuclei led to the formation of a compound which has the ability of inhibiting in vitro transcription (the isolated liver nuclei possess a drug-metabolizing activity located in the external nuclear envelope which belongs to the endoplasmic reticulum complex).

This conclusion was strengthened by the following results: first, the compound(s) formed during the preincubation with Tris-HCl buffer, pH 7.8, inhibited *E. coli* RNA polymerase whereas PRT imine was completely inactive. Second, it (they) also inhibited the translational capacity of amino acid incorporation promoted by isolated liver polysomes (compare results in

190

TABLE II
EFFECTS OF PREINCUBATION ON THE ACTIVITY OF PRT IMINE AND PRT

PRT imine and PRT were preincubated at 37°C for 15 min before being tested on either transcription or translation. The composition of the preincubation medium is given in the table. The transcription system contained 40 µg/ml PRT or 800 µg/ml PRT imine. The medium added is described in MATERIALS AND METHODS. When *E. coli* RNA polymerase (Miles Laboratories Inc., Elkhart, Indiana, USA) was used, the medium added for transcription contained Tris-HCl buffer pH 7.9, MnCl₂, MgCl₂, 3 unlabelled nucleoside-5'-triphosphates (ATP, GTP, CTP), [2-¹⁴C]UTP in order to give the final concentrations as previously described [4]. The assays were run at 37°C for 10 min. The translation system contained 200 µg/ml PRT or 1 mg/ml PRT imine. The reagents contained in the medium added are indicated in MATERIALS AND METHODS. The inhibition was calculated with regard to a control system containing DMSO alone. The experiments were repeated at least 3 times. The results of a typical series are reported in the table.

Composition of the assays	PRT imine					PRT				
Preincubation carried out at 37°C for 15 min										
Nuclei (0.1 ml)	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
10 mM Tris-HCl buffer pH 7.8 (0.1 ml)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
NADPH (1 mg per assay)	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
Compound to be tested	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
In vitro tests (transcription or translation)										
(NH ₄) ₂ SO ₄ (final concentration: 280 mM)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
Medium for transcription	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Nuclei (0.1 ml)	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
<i>E. Coli</i> RNA polymerase (5.4 units)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
% Inhibition	77	75	70	70	0	67	70	0		
Medium for translation assay						+			+	
Polysomes (0.150 ml)						+			+	
% Inhibition						59			68	

Tables I and II). These results definitively eliminate a possible enzymatic conversion due to the presence of nuclear enzymes even when nuclei were added after the preincubation step.

The foregoing results may be explained by the instability of PRT imine in aqueous medium. Under the conditions used for preincubation, PRT imine would be hydrolyzed to PRT. Some data lend support to this hypothesis. Thus, preliminary results obtained by chromatographic analysis of the products formed during the preincubation revealed two main spots in addition to PRT imine. The less polar spot showed a behaviour identical with that of PRT; the second spot apparently corresponded to a mixture. The overall yield of the reaction did not exceed 10% of the initial amount of PRT imine.

Additional evidence for the formation of PRT from PRT imine was provided by the following results: the inhibitory action of PRT on in vitro transcription was completely abolished when ammonium sulphate (final concentration: 280 mM) was added to the assay before the reaction was started by the addition of the suspension of nuclei [4]. The results reported in Table II show that similar properties were shared by the products formed during PRT imine conversion.

As far as the quantitation of the reaction is concerned, some data showed that 800 μg of PRT imine incubated in Tris-HCl buffer inhibited in vitro transcription to the same extent as 40 μg PRT (a 30-min preincubation of PRT imine did not increase the inhibition, i.e., the reaction seemed to reach equilibrium after 15 min at 37°C). Thus, it was suggested that the chemical conversion of PRT imine would roughly lead to a 5-10% yield of PRT. If confirmed, the foregoing results would allow us to explain the in vivo effects of PRT imine. Admitting that the formation of PRT from PRT imine takes place in vivo, it may be thought that, for the doses administered to the animals (15 mg/kg), the amount of PRT formed would be too small to induce toxic effects. Further investigations now in progress are aimed at defining more precisely the qualitative and the quantitative aspects of the chemical conversion of PRT imine.

ACKNOWLEDGEMENTS

The excellent technical assistance of Nicole Rousseau and Nicole Darraq is gratefully acknowledged. This work was partly supported by contract No. 76.4.090.7 from the "Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale".

REFERENCES

- 1 P.E. Still, R.D. Wei, E.B. Smalley and F.M. Strong, A mycotoxin from *Penicillium roqueforti* isolated from toxic cattle feed, Fed. Proc., 31 (1972) 733.
- 2 R.D. Wei, P.E. Still, E.B. Smalley, H.K. Schoes and F.M. Strong, Isolation and partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*, Applied Microbiol., 25 (1973) 111.
- 3 R.D. Wei, H.K. Schoes, E.B. Smalley, S.S. Lee, Y.N. Chang and F.M. Strong, Production, isolation, chemistry and biological properties of *Penicillium roqueforti* toxin, Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Tokyo, 1974, in press.
- 4 Y. Moulé, M. Jemmali and N. Rousseau, Mechanisms of the inhibition of transcription by PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*, Chem.-Biol. Interact., 14 (1976) 207.
- 5 R.D. Wei, H.K. Schoes, P.A. Hart and F.M. Strong, The structure of PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*, Tetrahedron, 31 (1975) 109.
- 6 S. Moreau, A. Gaudemer, A. Lablache-Combiere and J. Biguet, Métabolites de *Penicillium roqueforti*, PR toxine et métabolites associés, Tetrahedron Letters, 11 (1976) 833.
- 7 J.F. Bousquet, Isolement d'une substance phytotoxique des filtrats de culture de *Phoma exigua* var. *inoxidabilis*, Ann. Phytopathol., 5 (1973) 289.
- 8 C. Riche, C. Pascard-Billy, M. Devys, A. Gaudemer, M. Barbier and J.F. Bousquet,

- Structure cristalline et moléculaire de la phoménone, phytotoxine produite par le champignon *Phoma exigua* var. *inoxydabilis* Tetrahedron Letters, 32 (1974) 2765.
- 9 J. Chauveau, Y. Moulé and C. Rouiller, Isolation of pure and unaltered liver nuclei. Morphology and biochemical composition, Exp. Cell Res., 11 (1956) 317.
 - 10 G. Blobel and V.R. Potter, Ribosomes in rat liver: an estimate of the percentage of free and membrane-bound-ribosomes interaction with messenger RNA in vivo, J. Mol. Biol., 28 (1967) 539.
 - 11 A. Demarle and Y. Moulé, Effects of lasiocarpine on protein synthesis in rat liver, Int. J. Cancer, 8 (1971) 86.
 - 12 Y. Moulé, The effects of magnesium and manganese on the purine ratio of RNA transcribed in vitro by rat liver nuclei, Eur. J. Biochem., 17 (1970) 544.
 - 13 F.O. Wettstein and H. Noll, Binding of transfer ribonucleic acid to ribosomes engaged in protein synthesis: number and properties of ribosomal binding sites, J. Mol. Biol., 11 (1965) 35.
 - 14 R.J. Mans and G.D. Novelli, Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disc method, Arch. Biochem. Biophys., 94 (1961) 48.

Use of a Ciliate Protozoan for Fungal Toxins Studies

D. Dive¹, S. Moreau², and M. Cacan²

¹INSERM U 146 and ²INSERM U 42
Domaine du Certia
59650 Villeneuve D'Ascq - France

(with technical assistance of Priem M. N.¹ and Butryn A.²)

INTRODUCTION

Investigation in toxicity of unknown fungal metabolites is an important step in studies of mycotoxins. Up to now, most methods use mammaliáns (mice, rats), aquatic crustaceans (Daphnia, Artemia). Assays with mammaliáns require large quantities of substrate and these systems are usually limited in usefulness. Other technics such as tissue cultures are laborious or time consuming. Crustaceans remain the most convenient material (HARWIG and SCOTT 1971 ; EPPLEY 1974 ; JACQUET and BOUTIBONNES 1970). Bacteria, protozoa and algae have been used but never with extensive applications (HAYES et al. 1970, 1974 ; TENUISSON and ROBERTSON 1967).

In this paper, we describe the use of a ciliate protozoan *Colpidium campylum* as a valuable test for the detection of toxic fungal metabolites. We investigate its sensitivity to some known mycotoxins and to the metabolites of *Penicillium roqueforti*. Further investigations of the toxicity of some fatty acids which occur sometimes in fungal extracts (CURTIS et al. 1974) have been performed. The presented results show that *Colpidium campylum* appears to be a convenient system for testing toxicity of fungi.

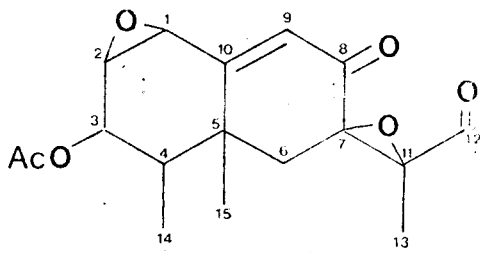
MATERIALS AND METHODS

Mycotoxins

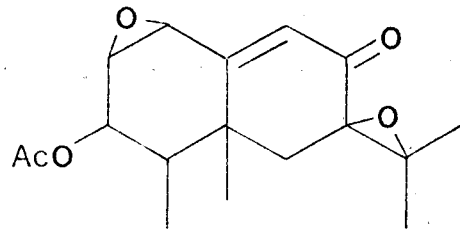
Penicillium roqueforti metabolites have been prepared as previously reported (MOREAU et al. 1976). Structure of compound 5 (Figure 1) is to be published in a chemical review. Aflatoxin B₁, Sterigmatocystin, Ochratoxin, Patulin, Diacetoxyscirpenol were purchased from MAKOR CHEMICALS. High purity (99 %) arachidonic, linoleic, linolenic,

Figure 1

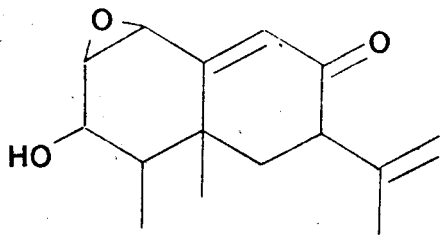
Structures of *P. roqueforti* metabolites



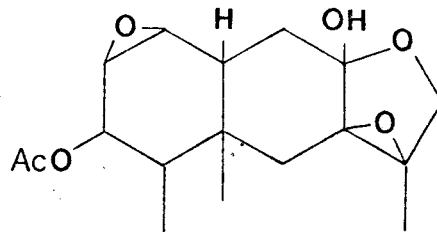
PRT 1



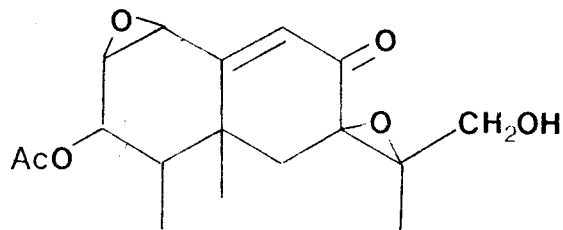
Eremofortin A 2



Eremofortin B 3



Eremofortin D 4



Eremofortin C 5



γ -linolenic and lauric acids from SIGMA CHEMICALS.

Bioassay Method

Method using *Colpidium campylum* for testing toxic compounds (mineral toxicants) has already been described in details (DIVE and LECLERC 1975, 1976, 1977). Mycotoxins were dissolved in acetone (0,25 ml) just before using, to obtain concentrations from 0,1 to 10 $\mu\text{g/ml}$ in cultures. Toxicity of each solution was evaluated in five replicates. Controls were performed with each serie of tests. Cultures were allowed to grow at 20° C for 43 hours. Toxicity of mycotoxins was evaluated by means of generation number. The Minimal Active Dose (M.A.D.) is the minimal amount of toxin which modifies the growth of the culture. Concentrations above 10 $\mu\text{g/ml}$ of mycotoxins have not been tested.

RESULTS

Sensitivity of *Colpidium campylum* to known mycotoxins

Table 1 shows that *C. campylum* is very sensitive to *P. roqueforti*. Toxicity is detected at the concentration of 0,25 $\mu\text{g/ml}$. The LD₅₀ value obtained for *P. roqueforti* toxin (P.R.T.) is just above the M.A.D.

TABLE 1
SENSITIVITY OF *Colpidium campylum*
TO SOME KNOWN MYCOTOXINS

<u>Toxin</u>	<u>Minimal Active Dose*</u> <u>(M.A.D.) $\mu\text{g/ml}$</u>
Aflatoxin B ₁	>10
Patulin	0.5
Diacetoxyscirpenol	0.5
Ochratoxin B	>10
Sterigmatocystin	>10
<i>Penicillium roqueforti</i> toxin	0.25

* evaluated by means of 5 determinations

The protozoan is less sensitive to patulin and diacetoxyscirpenol. These would have been detectable only if present at a concentration of 0,5 µg/ml. Aflatoxin B₁, Ochratoxin B and Sterigmatocystin present no toxicity when tested at 10 µg/ml.

So *C. campylum* shows a wide range of sensitivity to these known mycotoxins. It is at least 40 folds more sensitive to P.R.T. and 20 folds more sensitive to patulin than to the last 3 toxins.

Toxicity of PRT and metabolites of *P. roqueforti* (Table 2)

These compounds are closely related to PRT and are extracted from the same culture of *P. roqueforti*.

TABLE 2
TOXICITY OF *Penicillium roqueforti* TOXIN
AND METABOLITES OF *Penicillium roqueforti* TO
Colpidium campylum

Compounds	M.A.D. µg/ml
PR Toxin	0.25
Eremofortin A	> 10
Eremofortin B	> 10
Eremofortin C	> 10
Eremofortin D	> 10

PR Toxin is the only metabolite to exhibit a marked toxicity in this test.

Determination of the toxicity of fatty acids to *Colpidium campylum* (Table 3)

All fatty acids which have been tested are toxic toward *C. campylum*. Arachidonic acid is highly toxic to

the protozoan. The relationship between fatty acid structure and toxicity to *C. campylum* does not parallel that reported for an other organism *Artemia salina* (CURTIS et al. 1974). In that case saturated acids with a chain length of 10-13 carbon atoms, such as lauric acid showed the greatest toxicity and oleic linoleic, linolenic acids were the most toxic of the insaturated acids. *C. campylum* does not present such a sensitivity toward these fatty acids.

TABLE 3
TOXICITY OF FATTY ACIDS TO
Colpidium campylum AND *Artemia salina*

Acid	Structure*	M.A.D. ⁺ µg/ml	L.C.50 ^x µg/ml
Arachidonic acid	20:4	40	1.5.2
Linoleic acid	18:2	10	3.3
Linolenic acid	18:3	5<MAD<10	2.4
γ-Linolenic acid	18:3	5<MAD<10	
Lauric acid	12:0	5<MAD<10	5

* no of carbon atoms : no of double bonds

+ *Colpidium campylum* test

x lethal concentration assay method on the brine shrimp (*Artemia salina*) (CURTIS et al. 1974)

DISCUSSION

In the search of unknown toxic fungal metabolites the method described here cannot be considered as a screening system. When tested at concentration up to 10 µg/ml Aflatoxin B₁, Ochratoxin B, Sterigmatocystin are not detected. Aflatoxin B₁ has been shown to be degraded by an other protozoan *Tetrahymena pyriformis* (TENUISSON and ROBERTSON 1967) and so has no acute effect on population growth. This can be an explanation for the relative insen-

sibility of *Colpidium* toward Aflatoxin B₁. The use of additional biological screening systems may reduce the probability of this occurrence.

C. campylum can however be useful in the detection of strains producing patulin, diacetoxyscirpenol and PR toxin.

Previous investigations had showed that some common naturally occurring fatty acids possessed toxicity toward the brine shrimp (*Artemia salina*) comparable with that of several known mycotoxins tested in that system *Colpidium* was moderately sensitive to these acids.

We have studied the toxicity of PR toxin and the related metabolites purified from a culture of *Penicillium roqueforti*. The results clearly indicate that the toxicity region of the compounds is localized and chiefly due to functions on carbon atoms 7-8-11-12-13. An acute toxicity could be attributed to the aldehyde group on carbon 12. Results also suggest that the epoxyde on carbon atoms 7-11 apparently plays a minor part in the biological activity of the compounds. So the method described here can be suitable for evaluating toxicity of compounds of a metabolic route.

To extend the possibilities of our system and to improve the technical aspects of our test we are dealing with fungal filtrates and crude extracts.

ACKNOWLEDGEMENT

This work has been supported by "Ministère de la Qualité de la Vie", contrat N° 74-4.

REFERENCES

- CURTIS, R.F., COXON, D.T., LEVETT, G., Food Cosmet. Toxicol., 233-235 (1974)
- DIVE, D., LECLERC, H., Progress in Water Technology, 7 (2), 67-72 (1975)

- DIVE, D., LECLERC, H., Eur. J. Toxicol., 9 (2), 105-111
(1976)
- DIVE, D., LECLERC, H., Environ. Pollut. (1977) in press
- EPPLEY, R.M., J. Assoc. Off. Analyt. Chem., 57, 618-620
(1974)
- HARWING, J., SCOTT, P.M., Appl. Microbiol., 21, 1011-1016
(1971)
- HAYES, A.W., WYATT, E.P., Appl. Microbiol., 20 (1), 164-
165 (1970)
- HAYES, A.W., HELTON, R., SMITH, S.J., Bull. Environ. Contam.
Toxicol., 11 (4), 321-325 (1974)
- JACQUET, J., BOUTIBONNES, P., Bull. Acad. Vet. France,
43, 299-308 (1970)
- MOREAU, S., GAUDEMER, A., LABLACHE COMBIER, A., BIGUET, J.,
Tetrahedron Lett., 833-834 (1976)
- TENUISSEON, D.J., ROBERTSON, J.A., Appl. Microbiol., 15 (5),
1099-1103 (1967)

A C T I O N D E P R T A U N I V E A U D U D N A

Il n'existe pas de résultats concernant l'action à long terme de PRT, en particulier nous ne possédons aucune donnée sur sa potentialité cancérogène. Un des moyens d'aborder ce problème est d'étudier son action au niveau du DNA.

I - LIAISON DE PRT AUX MACROMOLECULES -

Ces travaux ont été réalisés par Y. MOULE. Nous avons préparé au laboratoire la toxine marquée au ^{14}C indispensable pour cette étude. Dans le but d'obtenir une activité spécifique plus importante que lors des marquages métaboliques, nous avons préparé PRT ^{14}C en acétylant avec AC_2O ^{14}C -(O) le dérivé 3-OH de PRT. Le marquage obtenu se situe donc sur le C-16 de PRT. L'activité spécifique obtenue est de 1 mci/mM dans un premier lot et de 20 mci/mM dans un deuxième lot.

PRT ^{14}C est incubée en présence de cellules hépatiques de rat ou de noyaux isolés de foie. On isole ensuite les macromolécules et on mesure la radioactivité qui leur est liée. Les détails expérimentaux et les résultats sont rapportées dans la publication jointe (Mutation Research).

On observe dans le tableau 1 de la publication que PRT se lie aux acides nucléiques et aux protéines, mais dans des proportions très variables, bien plus à l'A.D.N. qu'aux protéines, mais surtout il se lie à l'A.R.N.. Dans tous les cas, c'est avec les protéines que PRT présente le moins d'interactions. Ces résultats suggèrent que PRT se lie aux macromolécules.

II - ETUDE DE LA NATURE DE LA LIAISON PRT-MACROMOLECULES -

Nous avons entrepris ensuite une expérimentation plus spécifique pour préciser le type de liaisons impliquées dans les résultats précédents.

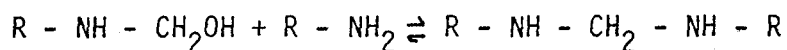
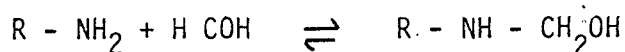
En incubant toujours PRT en présence de cellules en cultures ou de noyaux de ces cellules nous avons isolé les constituants macromoléculaires sur un gradient de chlorure de césium. Ce gradient permet d'obtenir une séparation des Protéines, ADN . et ARN . sur la base de leur densité. La fraction protéique reste à la surface du gradient, l' ADN . migre au niveau d $\sim 1,7$ et enfin l' ARN . se retrouve au culot du tube (d $\sim 1,9$).

Grâce à cette analyse, nous avons pu montrer que PRT établit des pourcentages entre le DNA et les protéines de la chromatine par l'intermédiaire de sa fonction aldéhyde qui contracte des liaisons avec les NH_2 des acides aminés et avec ceux des bases. Cette démonstration repose sur les preuves suivantes :

- La quantité de DNA . retrouvé à la densité 1,7 (caractéristique) est notablement diminuée dans le cas des cellules ou des noyaux incubés en présence de PRT par rapport aux témoins (tableau II de la publication). En contre-partie, on retrouve une quantité plus importante d' ADN . dans la fraction qui n'a pas sédimenté. Il existe une relation dose effet entre la quantité de PRT incubée et la diminution de la quantité de D.N.A. au niveau d $\sim 1,7$.
- Quand on incube les cellules ou les noyaux avec PRT ^{14}C , la fraction du DNA . qui migre à la densité théorique 1,7 est dénuée de toute radioactivité. Par contre, le DNA qui ne sédimente pas est marqué. On observe le même phénomène avec le RNA .
- Les pontages | DNA .-PRT-protéines peuvent être détruits par action de la pronase qui dégrade les protéines. Après action de cet enzyme, on retrouve par analyse en gradient de densité la quantité habituelle de DNA . de densité 1,7 (tableau III Mutation Research).
- Dans les expériences avec PRT ^{14}C , la fraction de DNA . qui n'est pas engagée dans le complexe DNA ., PRT, protéines n'est pas marquée. Quand le complexe DNA ., PRT, ^{14}C , protéines est traité à la pronase on retrouve après centrifugation du DNA marqué à la densité 1,7 (tableau III de la publication).

- Les composés dépourvus de fonction aldéhyde sont totalement inactifs dans le système. Tel est le cas de EA ou de la PR imine (tableau II).

Le mécanisme de cet effet de pontage serait le suivant : PRT par l'intermédiaire de sa fonction aldéhyde établit des pontages entre DNA et protéines. Ce type d'interaction est bien connu, des aldéhydes tels que le formol, l'acétaldéhyde forment des liaisons entre les groupements aminés d'acides nucléiques ou d'acides aminés (68). M.Y. FELDMAN (69) a proposé la formation de pont méthylène par l'intervention du schéma suivant :

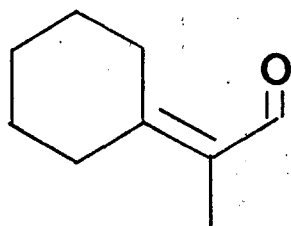


PRT pourrait donc par l'intermédiaire de sa fonction aldéhyde réaliser un pontage de ce type. L'absence de la fonction aldéhyde de PRT est suffisante pour ne pas induire ce pontage. Mais cette fonction est-elle seule impliquée ? Les fonctions époxydes, cétones insaturées ne participent-elles pas également à ce phénomène ? La réactivité de la fonction aldéhyde est-elle modifiée par les fonctions voisines ? C'est le phénomène que nous avons essayé d'aborder dans les expériences suivantes.

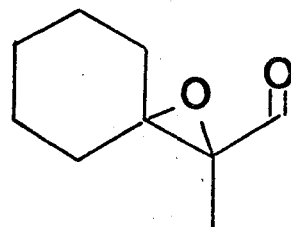
ROLE DES AUTRES GROUPEMENTS FONCTIONNELS DE PRT

Pour répondre à cette question, nous avons synthétisé des molécules possédant certains des groupements fonctionnels de PRT. La synthèse des composés est rapportée dans un chapitre suivant.

Nous présentons ici seulement les structures de ces composés :



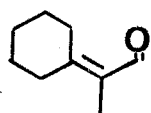
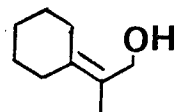
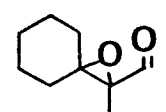
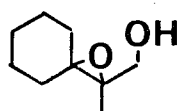
11a



12a

et leurs alcools correspondant 11b et 12b.

Nous avons testé tout d'abord la toxicité sur souris de ces divers produits. Les résultats montrent que les aldéhydes sont un peu plus toxiques que les alcools correspondants, mais que nous sommes loin des effets de PRT qui était létale à 10 mg/Kg.

	dose mg/Kg	Nombre d'animaux morts Nombre d'animaux injectés	délais
<u>11a</u> 	300	4/4	1 < 8h, 3 en 7j
	200	4/4	1 < 48h, 3 en 8j
	100	1/8	1 en 6j
<u>11b</u> 	300	4/4	48h
	200	3/4	1 en 24h, 2 en 5j
	100	1/4	4j
<u>12a</u> 	300	3/4	4j
	200	4/4	4j
	100	1/4	9j
<u>12b</u> 	300	3/4	1 < 48h, 2 en 7j
	200	2/4	15j

Nous avons examiné ensuite l'action de ces composés sur la transcription et la traduction *in vitro* : elle est pratiquement nulle sur le système de transcription *in vitro* utilisé (noyaux de cellules hépatiques). Elle est par contre manifeste sur la traduction *in vitro*.

Composés	% inhibition	Concentration µg/ml
<u>11a</u>	82	1000
<u>11b</u>	37	1000
<u>12a</u>	80	1000
<u>12b</u>	15	1000



Dans le même test, PRT inhibait la traduction à 68% pour une concentration de 200 µg/ml.

Enfin, nous avons examiné l'action de ces mêmes composés sur les macromolécules et nous avons testé leur aptitude à réaliser des partages ADN-protéines dans les mêmes synthèses que ceux utilisés pour PRT.

Nous avons observé que seuls les composés présentant une fonction aldéhyde sont actifs, mais à des concentrations 40 à 50 fois plus élevées que celles utilisées pour PRT (tableau II, Mutation Research).

Mutation Research, 77 (1980) 79-89
© Elsevier/North-Holland Biomedical Press

INDUCTION OF CROSS-LINKS BETWEEN DNA AND PROTEIN BY PR TOXIN, A MYCOTOXIN FROM *Penicillium roqueforti*

Y. MOULÉ, S. MOREAU^a and C. AUJARD

Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, Boîte Postale 8, 94800 Villejuif, and
^a *Unité INSERM U42, 59650 Villeneuve d'Ascq (France)*

(Received 22 May 1979)

(Revision received 27 July 1979)

(Accepted 6 August 1979)

Summary

PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*, induces DNA-protein cross-links in chromatin of both cultured cells and isolated rat-liver nuclei. The presence of the aldehyde group in the PRT molecule is required for the induction of cross-linking; methylene bridges between nucleic acid and protein are presumably involved in the complex formation. The role of other functional groups of PR toxin is discussed.

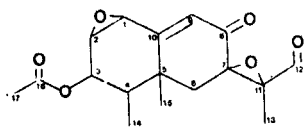
PR toxin (PRT), a mycotoxin synthesized by some strains of *Penicillium roqueforti*, produces acute toxic effects in various animals ($LD_{50} \sim 7$ mg/kg in rats and mice) [26,29]; it also impairs cell metabolism by inhibiting DNA [28 and results to be published], RNA and protein syntheses [18,20,21,28]. So far, the long-term effects of PRT have not been considered; in particular, there are no data available on its carcinogenic potency.

The study of the effects of PRT on DNA may be useful in the evaluation of its genetic toxicity. Apart from the results of Ueno and Kubota [27], which show the DNA-attacking ability of PRT in the assay with the recombination-deficient mutant of *Bacillus subtilis* and the parent strain H17 [12], nothing is known about this problem.

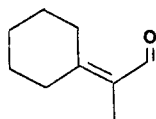
The present experiments were aimed at studying the action of PRT on DNA in eukaryotic cells in vivo and in vitro. The results show that PRT induces DNA-protein cross-links in both cultured cells and isolated rat-liver nuclei. The formation of the cross-links depends upon the presence of the aldehyde group

Abbreviations: DMSO, dimethylsulfoxide; PBS, phosphate-buffered saline; PRT, PR toxin; SDS, sodium dodecyl sulfate.

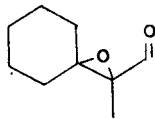
80



PR Toxin



Compound C



Compound D

Fig. 1. The structure of PR toxin and of compounds C and D. Compounds A and B have the same structures as C and D respectively, except that the aldehyde group has been reduced to the corresponding primary alcohol group.

at position 12 of the PRT molecule (Fig. 1). The mechanism of these interactions is discussed.

Materials and methods

Chemicals

PRT was isolated from cultures of *Penicillium roqueforti* according to the procedure described by Wei et al. [29]: its purity was checked by thin-layer chromatography. Before use, PRT was dissolved in DMSO (Rhône-Poulenc, Paris, France). [^{14}C]PRT was obtained by chemical synthesis from [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetic anhydride (57 mCi/mmole) (CEA, Saclay, France); the labeled C appeared at position 16 of the toxin molecule (Fig. 1). Labeled PRT was quantitatively analyzed by high-pressure liquid chromatography. The radioactivity was determined in a liquid-scintillation spectrometer (Intertechnique, Plaisir, France). Two preparations of [^{14}C]PRT were used: preparation A (specific activity: 1.02 mCi/mmole) and preparation B (21 mCi/mmole).

Compounds A, B, C, D were synthesized by methods to be published elsewhere.

Cesium chloride was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and pronase from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.).

Cell cultures

The F_1 cell line used was kindly supplied by Dr. E. Morel-Chany. It was derived from a primary culture of liver cells from a 10-day-old rat [16] according to the technique of Williams et al. [31]. The cells were grown in Williams's medium (Eurobio, Paris, France) supplemented with 15% fetal calf serum (Sorga, Paris, France). Antibiotics (neomycin, penicillin, streptomycin) and glutamine were also added to the medium. The cells were routinely passaged

following weekly trypsinization in Roux bottles (inoculum: 8×10^6 cells in 80 ml of medium).

Confluent cells were treated with a fresh solution of PRT in DMSO or with DMSO alone (the final concentration of DMSO was 0.3%, which did not affect the cells) and incubated for 1 h. The medium was then discarded, and cell monolayers were washed 3 times with 100 ml of PBS. The cells were detached from the glass surface by a 15-min incubation in 20 ml of 0.02% EDTA in PBS and dispersed by repeated pipetting. An aliquot of the cell suspension was diluted for cell counting in a Coulter counter (Coultronics, France). A second aliquot of the cell suspension (2 ml) was reserved for biochemical analysis; it was centrifuged, and the pellet was kept at -30°C before use. The rest of the suspension was centrifuged and the cells were collected for further analysis by cesium chloride isopycnic centrifugation.

Incubation of isolated liver nuclei

Liver nuclei were isolated from livers of male Wistar rats (Commentry strain) that were fasted for 18 h, according to Chauveau et al. [5]. Briefly, a 10% liver homogenate in 2.2 M sucrose (Analar BDH, Poole BH 12, England) containing 1 mM Mg^{2+} was centrifuged for 80 min at 19 000 rpm (Beckman J21, rotor JA20).

A pellet composed of nuclei isolated from 4 g of liver was resuspended in 10 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 10 mM EDTA; 20 μl of DMSO or DMSO containing PRT were added, and the suspension was incubated for 30 min at 37°C . The suspension was chilled at 0°C , then gently homogenized. A 5-ml fraction of the suspension was set aside for biochemical analysis and a 3-ml fraction for the preparation of chromatin. After centrifugation, the supernatants were removed and the pellets were kept for further steps.

Preparation of chromatin and cesium chloride isopycnic centrifugation

The pellets obtained from the cell cultures ($\sim 80 \times 10^6$ cells) or from incubated nuclei were resuspended in 10 ml of 0.08 M NaCl containing 20 mM EDTA (pH 6.2) in a teflon-glass homogenizer according to the technique described by Dingman and Sporn [6]. The suspension was centrifuged for 15 min at 5000 rpm (Beckman J21, rotor JA 20). The supernatant was discarded, and the pellet washed and re-extracted once with the same solution. The final pellet was suspended in 2.7 ml of 0.15 M NaCl, and 0.09 ml of 3% SDS was added. The suspension was homogenized in a Teflon-glass apparatus, and 1 ml of 6.75 M CsCl (d 1.83 g/cm^3) containing 0.1 M EDTA was added followed by 8 ml of 6.75 M CsCl. The mixture was transferred to a polyallomer tube; its density was 1.63 g/cm^3 . The tubes were centrifuged at 20°C for 40 h at 41 000 rpm (Spinco, rotor 50 Ti). The range of density values was then 1.52–1.76 g/cm^3 . The tubes were punctured, and successive 1-drop and 20-drop fractions were collected. The spectral absorbance was measured at 260 nm on the 1-drop fractions after dilution. The 20-drop fractions containing DNA were pooled and an equal volume of cold 20% TCA was added. The suspension was left to stand at -30°C overnight. The DNA was centrifuged, washed successively with 10% TCA, twice with 75% ethanol, then with absolute ethanol, and dried. It was then hydrolyzed in 3 ml of N HCl at 100°C for 20 min. The absorbance

TABLE 1

BINDING OF PR TOXIN TO DNA, RNA AND PROTEINS OF CULTURED CELLS AND ISOLATED NUCLEI

Experiment No.	PRT concentration (M)	Radioactivity added per flask (μ Ci)	Final specific radioactivity of PRT (mCi/mmole)	PRT bound to		
				DNA (moles PRT/ 10^6 nucleotides)	RNA (moles PRT/ 10^6 nucleotides)	Proteins (moles PRT/ 10^6 amino acid residues)
<i>Cultured cells</i>						
17	5×10^{-5}	1.5	1.02	877	35 101	—
	1×10^{-5}	0.3	1.02	272	6 612	—
24	1×10^{-4}	2	0.64	602	94 920	84
	3×10^{-5}	2	2.13	165	29 269	46
	1×10^{-5}	2	6.4	59	7 670	21
	3×10^{-6}	2	21	28	2 588	9
<i>Isolated nuclei</i>						
30	1×10^{-4}	2	1.82	71	164 846	42
	2.5×10^{-5}	2	7.27	15	26 703	10
	1×10^{-5}	2	18	6	10 682	4
40	1×10^{-4}	4	3.63	106	219 865	—
		2	1.82	102	210 823	—

Confluent F_1 cells were treated with [14 C]PRT dissolved in DMSO for 1 h, then treated as indicated in Materials and Methods. An aliquot of the cell suspension ($\sim 8 \times 10^6$ cells) was centrifuged and the pellet was analyzed. Isolated nuclei for 4 g of liver ($\sim 500 \times 10^6$ nuclei) were resuspended in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 10 mM EDTA and then incubated with [14 C]PRT for 30 min at 37°C. A 5-ml aliquot ($\sim 125 \times 10^6$ nuclei) of the resuspended nuclei was centrifuged and the pellet was kept for analysis (see Materials and Methods). The PRT concentration in the incubation medium was obtained by mixing [14 C]PRT and [12 C]PRT. Preparation A of [14 C]PRT was used for Expt. 17 and preparation B for the others. The final specific activity of PRT in the incubation medium was indicated in the table.

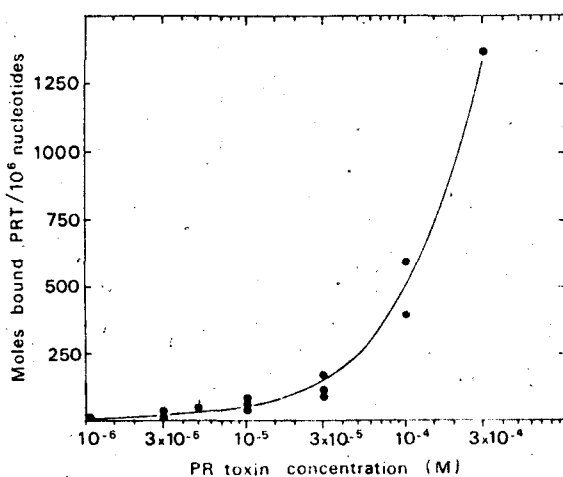


Fig. 2. Binding of PRT to DNA of F_1 cells plotted as a function of the toxin concentration in the culture medium (semi-logarithmic representation). The experimental conditions are described in the legend of Table 1. Preparation B of [14 C]PRT was used in the assays which corresponded to Expts. 24, 25, 57, 62 and 65.

was measured at 260 nm. When [^{14}C]PRT was used, the radioactivity of the DNA hydrolyzate was determined in a liquid-scintillation spectrometer. The results were expressed either in specific radioactivity (dpm/mg) or in terms of moles of bound PRT per 10^6 nucleotides.

The unsedimented material (pellicle) and the small pellet (RNA) obtained after gradient centrifugation were carefully removed and kept at -30°C before analysis.

Biochemical analysis

The samples of cells and of incubated nuclei, the pellicles and the pellets were fractionated according to a modification [17] of the Schmidt and Thannhauser technique [24]. DNA was determined by UV absorption, RNA by an adaptation [17] of the Mejbaum technique [15] and protein by the method published by Hartree [11]. When [^{14}C]PRT was used, the precipitate containing DNA and proteins was repeatedly washed with ice-cold PCA then centrifuged until the radioactivity of the supernatant was constant and corresponded to about that of a blank composed of the reagents only. The radioactivity of the RNA, DNA and protein fractions was determined in a liquid-scintillation spectrometer. The results were expressed either in specific radioactivity (dpm/mg) or in terms of moles of bound PRT per 10^6 nucleotides (DNA or RNA), or per 10^6 amino acid residues (proteins).

Results

The first step of this study was to look for the possibility of interaction between PRT and cellular macromolecules, especially DNA, by using [^{14}C]PRT added either to the cell-culture medium or to the incubation mixture of isolated liver nuclei. The radioactivity of DNA, RNA and proteins was determined after a conventional fractionation procedure carefully adapted to the objectives, i.e. an accurate determination of the specific radioactivities (see Materials and Methods).

In cultured cells as well as in isolated nuclei, interactions occurred between PRT and cellular macromolecules, but at different rates (Table 1). The toxin bound to RNA much more than to DNA; the lowest value of PRT binding was always found for proteins.

Concerning the interactions between DNA and PRT, a reasonably good correlation was observed between the PRT concentration in the medium and the amount of toxin bound to DNA (Fig. 2).

Although technical refinements have been applied in these determinations, a more specific method was used to confirm the preceding results. Equilibrium density-gradient centrifugation in cesium chloride appeared to be a suitable procedure for this purpose.

Induction of DNA-protein cross-links by PRT

Cultured cells and incubated isolated nuclei were extracted according to Dingman and Sporn's technique [6], and the material obtained was centrifuged in a cesium chloride gradient. The observations were based on the distribution

of DNA along the gradient and the labeling of DNA and RNA in the presence of [^{14}C]PRT.

(a) The distribution profile of DNA in controls gave a typical pattern with the main peak at the density of $\sim 1.7 \text{ g/cm}^3$ which corresponded to more than 50% of the initial DNA (Fig. 3 and Table 2). A small amount of DNA was recovered at the top of the gradient in the pellicle ($d \sim 1.52 \text{ g/cm}^3$). In most cases this unsedimented material represented between 5 and 10% of the initial DNA. Dispersed material was present in the upper zones of the tube.

A 1-h PRT treatment severely modified the sedimentation pattern of DNA (Fig. 3). The amount of DNA that banded at $\sim 1.7 \text{ g/cm}^3$ was dramatically reduced: the higher the PRT concentration, the lower the quantity of DNA found at this position (Table 2, expts 8,17,27,40,45).

Conversely, the amount of DNA remaining at the top of the gradient increased and, here again, a rough dose-effect relationship was observed (Table 2). A slight increase in the dispersed material was also seen in the upper part of the gradient.

Thus, PRT reduced DNA extractability when chromatin was treated with a saline solution of high ionic strength for dissociating its components. This observation is currently interpreted as a consequence of DNA-protein cross-links

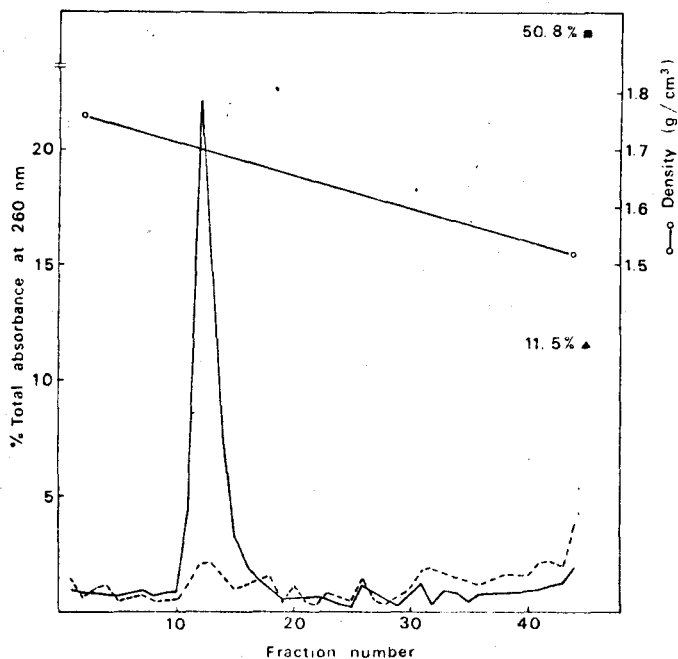


Fig. 3. Effect of PRT treatment on the equilibrium sedimentation pattern of F_1 cells in cesium chloride gradient. Confluent F_1 cells (100×10^6 cells) were treated with PRT for 1 h then treated as indicated in Materials and Methods. Cells were extracted for the isolation of chromatin which was centrifuged in a cesium chloride gradient for 40 h at 41 000 rpm. The tubes were punctured and 5-drop fractions were collected. The absorbance was measured at 260 nm after dilution to a final volume of 1.5 ml. DNA was determined on the unsedimented material. —, control cells; - - - - - , cells treated with 1×10^{-4} M PRT; \blacktriangle , DNA (expressed as UV absorbance) of the unsedimented material obtained from control cells; \blacksquare , DNA of the unsedimented material from PRT-treated cells.

TABLE 2

AMOUNTS OF DNA RECOVERED IN VARIOUS FRACTIONS AFTER ISOPYCNIC CENTRIFUGATION OF CHROMATIN (EXPRESSED AS PERCENTAGE OF THE INITIAL DNA)

Experiment No.	Treatment of the sample	DNA banded at $d \sim 1.7 \text{ g/cm}^3$	DNA un-sedimented	DNA dispersed ^b $1.52 < d < 1.7 \text{ g/cm}^3$
<i>Cultured cells</i>				
8	Control	51	10.9	38.1
	7×10^{-5} M PRT	8.7	75	16.3
17	Control	61.6	19.8	18.6
	5×10^{-5} M PRT	27.3	46.5	26.2
	1×10^{-5} M PRT	53	22.4	24.6
<i>Isolated nuclei</i>				
27	Control	51	5.7	43.3
	1×10^{-4} M PRT	24	17.5	58.5
	3×10^{-5} M PRT	35.5	10.1	54.4
	1×10^{-5} M PRT	58.8	8.8	32.4
40	Control	50.1	5.8	44.1
	1×10^{-4} M PRT	26.6	23	50.4
	1×10^{-4} M PRT followed by pronase treatment	47.2	0.3	52.5
55	Control	49.3	4.4	46.3
	1×10^{-4} M PRT previously treated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ^a	47	5.7	47.3
45	Control	59.4	—	—
	1×10^{-4} M PRT	25.3	—	—
	1×10^{-4} M eremofortin A	56.9	—	—
48	Control	52.4	5.6	42
	4×10^{-3} M compound C	36.8	6.7	56.5
49	Control	55.1	6.1	38.8
	4×10^{-3} M compound D	30	7.6	62.4
	4×10^{-3} M followed by pronase treatment	58	~0	42

Confluent F₁ cells or isolated nuclei were treated with PRT for 1 h then treated as indicated in Materials and Methods. Cultured cells ($\sim 80 \times 10^6$ cells) or incubated nuclei were extracted for the isolation of chromatin which was centrifuged in a cesium chloride gradient for 40 h at 41 000 rpm (Spinco, rotor 50 Ti). After centrifugation, the material that had not sedimented was recovered at the top of the gradient as a pellicle and kept for analysis. The gradient was monitored as indicated in Materials and Methods. Biochemical analysis was carried out on the pellicle and on the DNA recovered at $d \sim 1.7 \text{ g/cm}^3$. Ereremofortin A, PRT, and compounds C and D were dissolved in DMSO. The controls contained the same amount of DMSO as that added in toxin-treated samples. For pronase treatment, a solution was used containing 2.5 ml of 0.15 M NaCl and predigested for 15 min at 37°C. Chromatin was resuspended in 2.7 ml of 0.15 M NaCl and treated by 0.1 ml of pronase solution for 30 min at 37°C. At the end of the enzymic action, 0.09 ml of 3% SDS was added and the sample was processed as indicated in Materials and Methods.

^a The solution of PRT was made in DMSO containing 286 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and kept for one week at 4°C before use.

^b Calculated: (100 minus values found for the other two fractions).

introduced in nucleoprotein by chemical or physical agents [1,3,4,7,9,30]. The buoyant density of the complex thus formed was a function of the relative proportions of DNA and protein, which depend upon the concentration of the chemical [3,14,30] or the dose of irradiation [4,14,25].

It has been shown that protease action can cleave the cross-linking induced

in nucleoproteins and then liberate DNA [3,9,10,30]. The results in Table 2 (Expt. 40) show that pronase treatment completely reversed the effects produced by PRT; this observation confirms the view that proteins are involved in the PRT-induced complex.

(b) The labeling of DNA (and RNA) after [^{14}C]PRT action and isopycnic centrifugation of the treated material presents a clear-cut situation. The part of DNA that migrated at its theoretical buoyant density value ($\sim 1.7 \text{ g/cm}^3$) was always completely devoid of radioactivity, as was RNA pelleted at the bottom of the tube (Table 3). By contrast, unsedimented DNA was, in general, more heavily labeled than was initial DNA. These results show that PRT induced DNA-protein cross-links in chromatin. After isopycnic centrifugation, only the part of DNA not engaged in the complex sedimented at its theoretical density value. The absence of labeling in this fraction is then easily understood. PRT-induced DNA-protein complexes were distributed at lower buoyant densities in the upper zones of the gradient or remained at the top in the pellicle. However, when [^{14}C]PRT-treated chromatin was submitted to further pronase action, a fraction of the labeled DNA banded at $d \sim 1.7 \text{ g/cm}^3$ which corresponded to a DNA implicated in cross-linking, then freed of protein by pronase, but still bound to PRT (Table 3, Expt. 40).

A parallel explanation may be proposed for ribonucleoproteins.

Chemical groups of PRT implicated in cross-linking

The induction of DNA-protein cross-links mediated by an aldehyde group

TABLE 3
SPECIFIC RADIOACTIVITY OF DNA AND RNA FROM CELLS AND ISOLATED NUCLEI TREATED BY [^{14}C]PRT TOXIN AND CENTRIFUGED IN ISOPYCNIC CESIUM CHLORIDE GRADIENT

Experiment No.	PRT concentration (M)	Specific radioactivity (dpm/mg)			
		DNA		RNA	
		recovered at $d \sim 1.7 \text{ g/cm}^3$	unsedimented	pelleted	unsedimented ($\times 10^{-3}$)
<i>Cultured cells</i>					
17	5×10^{-5}	~ 0	10 100	~ 0	984
	1×10^{-5}	~ 0	4 900	~ 0	275
<i>Incubated nuclei</i>					
30	1×10^{-4}	~ 0	3 940	23	156
	1×10^{-5}	~ 0	1 750	13	159
40	1×10^{-4}	10	2 450	22	209
	1×10^{-4} followed by pronase treatment	235	a	204	a

Confluent F_1 cells or isolated nuclei were treated with [^{14}C]PRT for 1 h as indicated in Materials and Methods. The experimental conditions were identical with those described in Table 1. Cultured cells ($\sim 80 \times 10^6$ cells) or incubated nuclei ($\sim 125 \times 10^6$ nuclei) were extracted for isolating chromatin. The material obtained was centrifuged in a cesium chloride gradient for 40 h at 41 000 rpm. Biochemical analysis was carried out on the pellicle, on the DNA recovered at $d \sim 1.7 \text{ g/cm}^3$ and on the pellet of RNA (see Materials and Methods). The treatment by pronase is described in Table 2.

^a The amount of material recovered in these fractions was too small for study.

has been demonstrated for formaldehyde and other aldehydes [3,14,22,30]. Indeed, it is likely that aldehydes act as bifunctional agents via methylene bridges between amino groups of nucleic acid and protein moieties. (See reviews by Feldman [8] and by Auerbach et al. [2].) Thus it is reasonable to think that the aldehyde group of PRT was responsible for the observed interactions between DNA and protein. The following experiments confirmed this hypothesis. First, PRT previously treated by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a treatment which leads to the formation of PRT-imine with concomitant disappearance of the aldehyde group [19,21], no longer induced cross-links (Table 2, Expt. 55). In addition, eremofortin A, a PRT-related compound devoid of aldehyde function [21], also failed to cause the phenomenon (Table 2, Expt. 45).

Thus, a PRT-aldehyde group is implicated in DNA-protein cross-linking. However, taking into account the presence of other well-known reactive functions in its chemical structure (ketone, epoxide), one may ask whether these functional groups play any role in the cross-linking.

In an attempt to answer this question, compounds were synthesized that mimic the right part of the PRT molecule (Fig. 1). Compounds A and B, devoid of an aldehyde group, did not induce any cross-links (not shown). Compounds C and D both have an aldehyde group but they lack the conjugated ketone group found in PRT. In addition, an epoxide adjacent to the aldehyde group is present in compound D but is absent from compound C. The results in Table 2 (Expts. 48 and 49) show that both compounds caused a reduction in the DNA extractability of chromatin in cesium chloride gradient but to a much lesser extent than did PRT.

These results confirm the primary importance of the aldehyde group in DNA-protein cross-links induced by PRT. They also raise the question as to whether other parts of the molecule participate in the phenomenon.

Discussion

The results reported here demonstrate the induction of cross-links between DNA and protein by PRT; they also provide additional information on the mechanism of such interactions. The presence of the aldehyde group on the PRT molecule is required for the induction of cross-linking in chromatin. Methylene bridges between nucleic acid and protein are presumably involved in the complex formation [2,8]. In the case of formaldehyde action, it has been shown that some of the cross-links could involve the two strands of DNA [30]. The present results do not indicate whether PRT induces any interstrand alteration.

Concerning the role of other functional groups of PRT, it is clear that the epoxide group adjacent to the aldehyde does not significantly influence the reaction. By contrast, the effectiveness of aldehyde reactivity may depend upon the presence of other functional groups existing in the right part of PRT (ketone, double bond) and/or on the left part of the molecule. The availability of new compounds related to PRT structurally, in particular analogs of compound D having a ketone group in the correct position, would be useful for studying the problem. Experiments are now in progress along this line.

The present results also establish the high affinity of PRT for ribonucleopro-

teins where RNA—protein cross-links are certainly formed.

The problem of repair of cross-links must also be considered. Evidence for repair of this type of damage induced by formaldehyde in both bacterial [30] and eukaryotic cells [13 and N. Magana-Schwencke and E. Moustacchi, personal communication] has been demonstrated. Repair of similar lesions provoked by X-rays or by UV irradiation has also been observed [7,10].

We have studied the repair of lesions produced by PRT in cultured cells. The appearance of single-strand breaks in alkaline sucrose gradients was observed that may suggest the occurrence of an incision step. However, further stages of the process appeared highly complex (manuscript in preparation).

So far, there is no evidence for establishing a relationship between cross-linking induction by PRT and its mutagenic (or carcinogenic) potency. The fact that formaldehyde has a weak mutagenicity confirms this view [23].

To learn more about the possible long-term effects of PRT, we tested the toxin in short-term assays currently used to detect the mutagenic potency of chemicals. Preliminary results show that the mycotoxin would have a very low (if any) mutagenic action. Further experiments now in progress are aimed at studying this point more precisely.

Acknowledgements

The authors wish to thank N. Rousseau and N. Darracq for their excellent technical assistance and A. Clolus for preparing the typescript.

This work was supported by contract No. 76.80 from the "Ministère de l'Environnement et du Cadre de Vie (Section: Contamination des Chaînes Biologiques)" and by contract No. 77.7.1353 from the "Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique".

References

- 1 Alexander, P., and H. Moroson, Cross-linking of deoxyribonucleic acid to protein following ultraviolet irradiation of different cells, *Nature (London)*, 194 (1962) 882—883.
- 2 Auerbach, C., M. Moutschen-Dahmen and J. Moutschen, Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds, *Mutation Res.*, 39 (1977) 317—362.
- 3 Brutlag, D., C. Schlehüser and J. Bonner, Properties of formaldehyde-treated nucleohistone, *Biochemistry*, 8 (1969) 3214—3218.
- 4 Celis, J.E., M. Fink and K. Kalltoft, On the use of ultraviolet light to study protein—DNA cross-link, *Nucleic Acid Res.*, 3 (1976) 1065—1071.
- 5 Chauveau, J., Y. Moulé and C. Rouiller, Isolation of pure and unaltered liver nuclei, Morphology and biochemical composition, *Exp. Cell Res.*, 11 (1956) 317—321.
- 6 Dingman, C.W., and M.B. Sporn, The-binding of aminodyes to rat liver DNA in vivo, *Cancer Res.*, 27 (1967) 938—944.
- 7 Feldberg, R.S., and L. Grossman, A DNA binding protein from human placenta specific for ultraviolet damaged DNA, *Biochemistry*, 15 (1976) 2402—2408.
- 8 Feldman, M.Y., Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 13, Academic Press, New York, 1973, pp. 1—49.
- 9 Fornace, A.J., and K.W. Kohn, DNA—protein cross-linking by ultraviolet radiation in normal human and Xeroderma pigmentosum fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 435 (1976) 95—103.
- 10 Fornace, A.J., and J.B. Little, DNA crosslinking induced by X-rays and chemical agents, *Biochim. Biophys. Acta*, 477 (1977) 343—355.
- 11 Hartree, E.F., Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Anal. Biochem.*, 48 (1972) 422—427.
- 12 Kada, K., K. Tsuchikawa and Y. Sadaie, In vitro and host-mediated "rec-assay" procedure for screening chemical mutagens and phloxine mutagenic red dye detected, *Mutation Res.*, 16 (1972) 165—174.

- 13 Magana-Schwenke, N., B. Ekert and E. Moustacchi, Biochemical analysis of damage induced in yeast by formaldehyde, I. Induction of single-strand breaks in DNA and their repair, *Mutation Res.*, 50 (1978) 181-193.
- 14 Magana-Schwenke, N., and B. Ekert, Biochemical analysis of damage induced in yeast by formaldehyde, II. Induction of cross-links between DNA and protein, *Mutation Res.*, 51 (1978) 11-19.
- 15 Mejsbaum, W., Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 258 (1939) 117-120.
- 16 Morel-Chany, E., C. Guillouzo, G. Trincal and M.F. Szajnert, "Spontaneous" neoplastic transformation in vitro of epithelial cell strains of rat liver: cytology, growth and enzymatic activities, *Eur. J. Cancer*, 14 (1978) 1341-1352.
- 17 Moulé, Y., Étude des acides nucléiques et de certains dérivés organiques et inorganiques du phosphore dans les tissus animaux, I. Foie et rate de la poule normale, *Arch. Sci. Physiol.*, 7 (1953) 161-188.
- 18 Moulé, Y., M. Jemmali and N. Rousseau, Mechanism of the inhibition of transcription by PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*, *Chem.-Biol. Interact.*, 14 (1976) 207-216.
- 19 Moulé, Y., M. Jemmali, N. Rousseau and N. Darracq, Action of monovalent cations on the biological properties of PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*, *Chem.-Biol. Interact.*, 18 (1977) 153-162.
- 20 Moulé, Y., M. Jemmali and N. Darracq, Inhibition of protein synthesis by PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*, *FEBS Lett.*, 88 (1978) 341-344.
- 21 Moulé, Y., S. Moreau and J.F. Bousquet, Relationship between the chemical structure and the biological properties of some cremophilane compounds related to PR toxin, *Chem.-Biol. Interact.*, 17 (1977) 185-192.
- 22 Ristow, H., and G. Obe, Acetaldehyde induces cross-links in DNA and causes tester-chromatid exchanges in human cells, *Mutation Res.*, 58 (1978) 115-119.
- 23 Sasaki, Y., and R. Endo, Mutagenicity of aldehydes in Salmonella, *Mutation Res.*, 54 (1978) 251 A.
- 24 Schmidt, G., and S.J. Thannhauser, A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 83-89.
- 25 Smith, K.C., Dose dependent decrease in extractability of DNA from bacteria following irradiation with ultraviolet light or visible light plus dye, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 8 (1962) 157-163.
- 26 Still, P.E., R.D. Wei, E.B. Smalley and F.M. Strong, A mycotoxin from *Penicillium roqueforti* isolated from toxic cattle feed, *Fed. Proc.*, 31 (1972) 733 A.
- 27 Ueno, Y., and K. Kubota, DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant of *Bacillus subtilis*, *Cancer Res.*, 36 (1976) 445-451.
- 28 Wei, R.D., H.K. Schnoes, E.B. Smalley, S.S. Lee, Y.N. Chang and F.M. Strong, Production, isolation, chemistry and biological properties of *Penicillium roqueforti* toxin, Symposium on Mycotoxins, 1973.
- 29 Wei, R.D., P.E. Still, E.B. Smalley, H.K. Schnoes and F.M. Strong, Isolation and partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*, *Appl. Microbiol.*, 25 (1973) 111-114.
- 30 Wilkins, R.J., and H.D. Macleod, Formaldehyde induced DNA-protein crosslinks in *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, 36 (1976) 11-16.
- 31 Williams, G.M., E.K. Weisburger and J.H. Weisburger, Isolation and long-term cell culture of epithelial like cells from rat liver, *Exp. Cell Res.*, 69 (1971) 106-112.

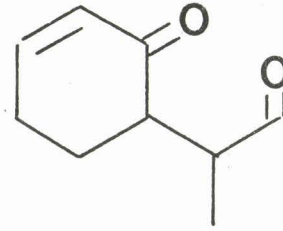
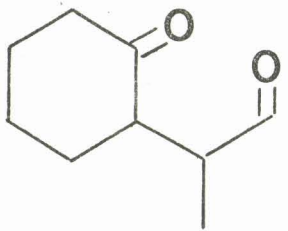
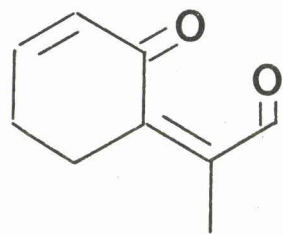
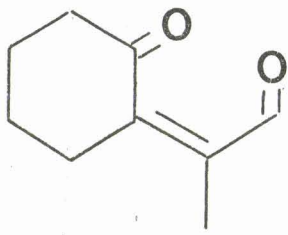
C O N C L U S I O N D E S E F F E T S B I O L O G I Q U E S

Nous avons vu que PRT était un inhibiteur des processus de replication, transcription et traduction. Nous avons montré que la fonction aldéhyde de PRT joue un rôle déterminant dans toutes ses propriétés biologiques. Nous avons aussi observé qu'une fonction aldéhyde conjuguée à une double liaison ou un époxyde peut produire des effets analogues à PRT, mais à des doses nettement plus élevées. Cette série de mesures met en effet en évidence l'activité importante de PRT par rapport à des composés possédant la fonction aldéhyde indispensable dans un squelette carboné proche.

L'examen de la littérature sur la toxicité des aldéhyde ou de leurs activités biologiques souligne également cet aspect. Il existe peu de données sur la toxicité des aldéhydes. Les aldéhydes insaturés (acroléine, crotonaldéhyde) sont plus toxiques que les aldéhydes saturés (propionaldéhyde, butyraldéhyde) pour les souris qui les inhalent suivant H. SALEM (70). Le formaldéhyde présente une activité intermédiaire. La toxicité diminue avec la longueur de chaîne. Le Valéraldéhyde est pratiquement neutre du point de vue biologique.

La toxicité *in vivo* sur souris a été rapportée par H. ZOLLNER (71) ; seuls les aldéhydes insaturés ont été testés. L'acroléine est de loin le plus toxique avec une DL 50 de 6 mg/Kg (0,10 mmol/Kg). Le crotonaldéhyde est déjà nettement moins actif : 160 mg/Kg (2,3 mmol/Kg).

La toxicité de PRT apparaît donc exceptionnelle, c'est pourquoi il paraissait intéressant de disposer de modèles synthétiques de PRT plus élaborés. Malheureusement nos tentatives pour synthétiser des composés tels que ci-dessous a échoué.

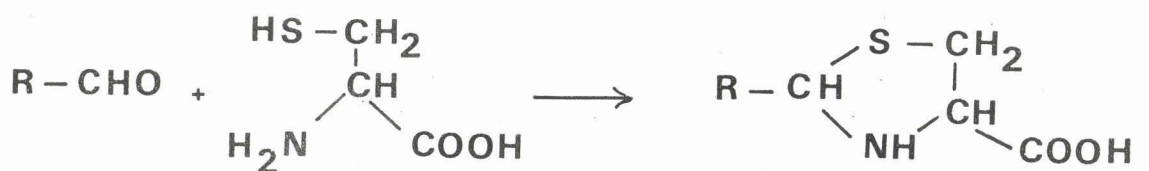


Il s'ensuit qu'il est impossible dans l'état actuel de nos travaux de dégager le rôle de la fonction cétone-conjuguée dans l'activité de l'aldéhyde α époxydique qu'est PRT. Il est bien évident que nos modèles sont loin du squelette complet de PRT, mais l'on imagine mal l'intervention du cycle gauche de PRT sur la réactivité de la fonction aldéhyde.

Comment les aldéhydes réagissent-elles avec les composés cellulaires ? Quelles sont leurs cibles préférentielles ? Nous avons, pour répondre à ces questions, fait un examen de la littérature.

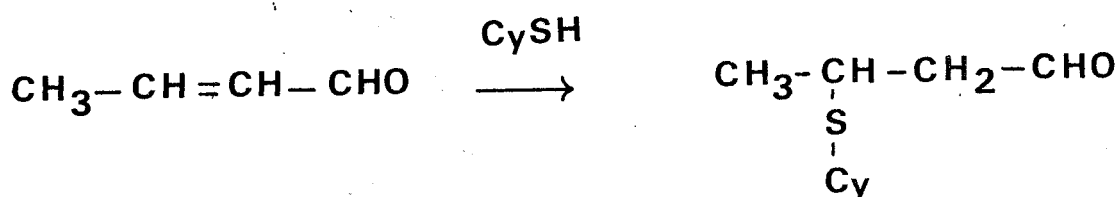
Les aldéhydes réagissent d'une part avec les groupements thiols des acides aminés libres ou des protéines et d'autre part sur les groupes aminés d'acides aminés, de protéines ou d'acides nucléiques.

Par exemple, les aldéhydes saturés réagissent sur la cystéine pour donner des acides du type (71) :

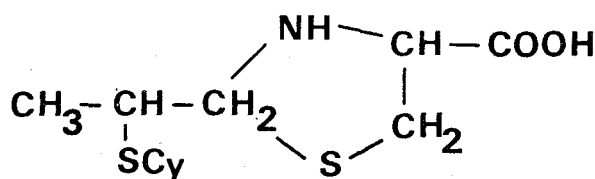


De tels dérivés ont été isolés de tissus traités par des aldéhydes aliphatiques (72).

Dans le cas des aldéhydes insaturés, les thioles réagissent plus rapidement que les amines. Dans le cas de la cystine, l'action de l'acroléine ou du crotonaldéhyde, conduit à une première addition 1,4 :



et se poursuit par une seconde addition sur la fonction aldéhyde restante (73) :



L. LORETI a proposé que l'effet d'inhibition sur la synthèse protéique des aldéhydes est dû à la chute de la concentration en cystine (74).

Dans le cas de PRT nous n'avons pas étudié l'action de ce composé sur des amines ou aminoacides. Nous avons montré, dans le test *in vitro* sur la traduction que PRT agissait au niveau du pH 5 enzyme. Son action ne peut s'expliquer dans ce test pas une action directe sur les acides aminés.

Les liaisons entre ADN et protéines impliquent bien évidemment la réaction de la fonction aldéhyde avec les fonctions amines des bases et des protéines.

L'activité particulièrement importante de PRT pourrait s'expliquer dans ce cadre soit :

- par une réactivité élevée de la fonction aldéhyde (due aux fonctions voisines ?),
- par une stabilité accrue des intermédiaires de réaction (imines, participation des fonctions voisines à cette stabilité ?).

Nous ne pouvons pas, actuellement, conclure dans ce domaine.

M É T A B O L I S A T I O N H É P A T I Q U E
D E S M É T A B O L I T E S D E *P. roqueforti*

Avant d'exposer nos travaux entrepris dans le but de comprendre le mode d'élimination de la toxine chez le rat, nous ferons un bref rappel des mécanismes connus du système de détoxication.

I - GENERALITES SUR LE MECANISME DE DETOXICATION -

En réponse à l'ingestion de substances qui leur sont étrangères, les mammifères ont la propriété de transformer, de métaboliser ces substances de manière à les éliminer, restaurant ainsi leur intégrité.

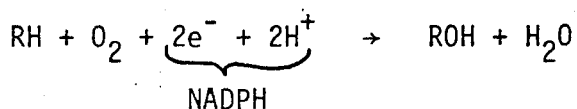
Le métabolisme de ces substances a lieu essentiellement dans le foie. Dans ces voies métaboliques, les composés exogènes sont transformés chimiquement par des réactions de réduction, d'oxydation, d'hydrolyse et de conjugaison. L'effet essentiel de ces réactions est de rendre hydrosolubles des composés initialement liposolubles, ce qui permet leur excrétion par la voie urinaire. En général, la biotransformation correspond à une baisse de la toxicité de la substance absorbée. C'est pourquoi ces métabolisations sont couramment désignées par le terme réaction de détoxication. Mais cette métabolisation peut tout aussi bien conduire à une activation ou à une augmentation de la toxicité des substances étrangères. C'est le cas par exemple des hydrocarbures aromatiques polycycliques dont les époxydes formés par biotransformation sont cancérigènes. C'est le cas également de l'Aflatoxine dont le métabolite actif (jamais isolé) est très certainement l'époxyde de la double liaison 8,9 (59).

Les enzymes responsables sont localisées dans le réticulum endoplasmique de la cellule qui constitue un réseau tubulaire de lipoprotéines s'étendant sur l'ensemble du cytoplasme. Le réticulum endoplasmique "rugueux" est enveloppé de ribosomes (lieux de la synthèse protéique), tandis que le réticulum endoplasmique "lisse" en semble dépourvu. Ce dernier, par contre, semble être le plus riche en enzymes de détoxication.

Le terme de fraction microsomale ou de microsomes désigne la fraction préparée ainsi : les cellules sont broyées avec un système adapté à chaque type de cellules. Au cours de ce broyage le réticulum endoplasmique forme des petites vésicules (les microsomes). Ces microsomes sont isolés par centrifugation du broyat à 10.000g pour environ 20 minutes (on élimine ainsi les débris cellulaires, les noyaux et les mitochondries. Le surnageant résultant est ensuite centrifugé à 100.000g pour une heure. La fraction microsomale est constituée par le culot obtenu au cours de cette opération. Le surnageant constitue le cytosol.

Le culot est dispersé dans une solution tampon et son activité enzymatique est mesurée.

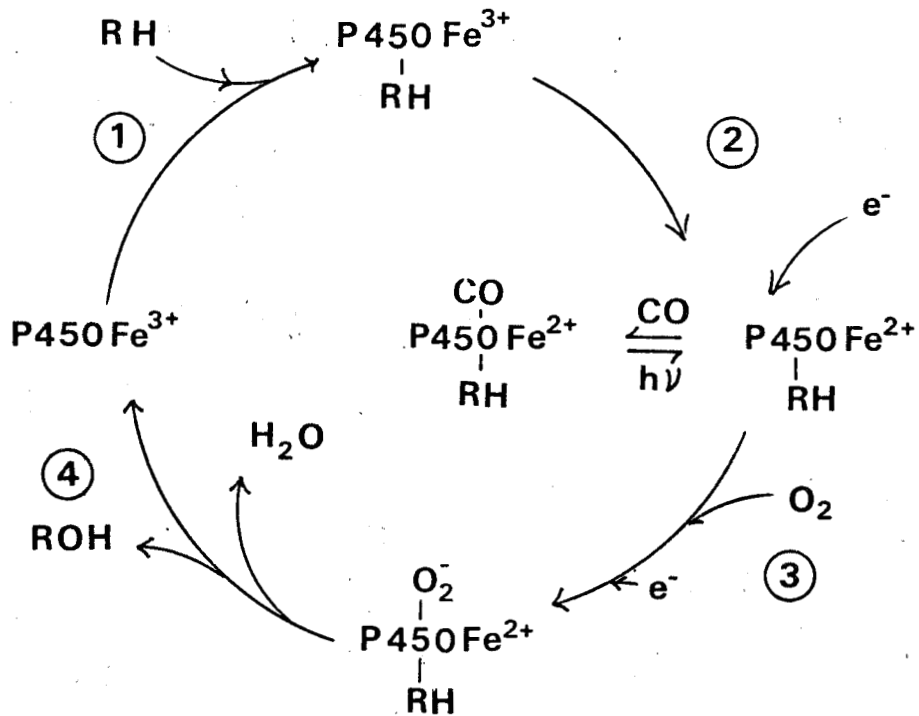
L'activité de ces fractions (en ce qui concerne les oxydations) nécessite de l'oxygène moléculaire et du NADPH^{**} (donneur d'électrons). Le bilan global peut s'écrire :



Un des atomes de l'oxygène moléculaire est incorporé sur le substrat, l'autre est réduit en eau. C'est cet aspect qui est à l'origine du terme : oxygénase à fonction mixte. Le terme monooxygénase qui est fréquemment utilisé, signifie que ces enzymes effectuent le transfert d'un atome d'oxygène sur le substrat. L'enzyme clé de ces oxydases est une hémoprotéine centrée sur un atome de Fer appelé cytochrome P-450. Il doit son nom au fait que sous forme réduite et en présence de monoxyde de carbone, le spectre d'absorption dans le visible fait apparaître une bande avec un maximum à 450 nm. C'est le cytochrome P-450 qui catalyse l'insertion d'un atome d'oxygène dans la molécule de substrat. On trouve le cytochrome P-450 aussi bien dans le règne végétal que dans le règne animal. On peut actuellement proposer un mécanisme

** NADPH = phosphate de nicotiamide adénine dinucléotide réduit.

de fonctionnement du P-450 :



Ce mécanisme comprend 4 étapes :

- 1° - Liaison du substrat avec le cytochrome P-450 sous forme oxydée.
- 2° - Réduction du complexe Ferrique en Ferreux.
- 3° - Fixation et activation de l'oxygène.
- 4° - Transfert de l'oxygène sur le substrat.

Ce système enzymatique possède quelques propriétés remarquables :

- 1° - Une faible spécificité vis-à-vis de ses substrats. Il est capable de métaboliser une grande variété structurale de substrats.
- 2° - Il est inductible par les composés qu'il métabolise. Les barbituriques induisent l'activité des enzymes hépatiques microsomaux, ce qui a pour conséquence une accélération du

métabolisme d'un grand nombre de substances non apparentées du point de vue structural avec l'agent inducteur.

Dans le cas des réactions de réduction qui font également partie du mécanisme de détoxification, la localisation la plus générale est le cytosol de la cellule. Tel est le cas des alcools déhydrogénases qui catalysent les conversions alcool, aldéhyde (ou cétones).

Enfin, la conjugaison, qui est la dernière étape du processus de détoxification, est catalysée par des glucuronyl-transférases (dans le cas de la glucuronoconjugaison) localisées dans la fraction microsomale.

Toutes les données présentées ici sont issues de diverses études tant réalisées *in vivo* qu' *in vitro*. La référence (60) couvre l'ensemble de ce chapitre.

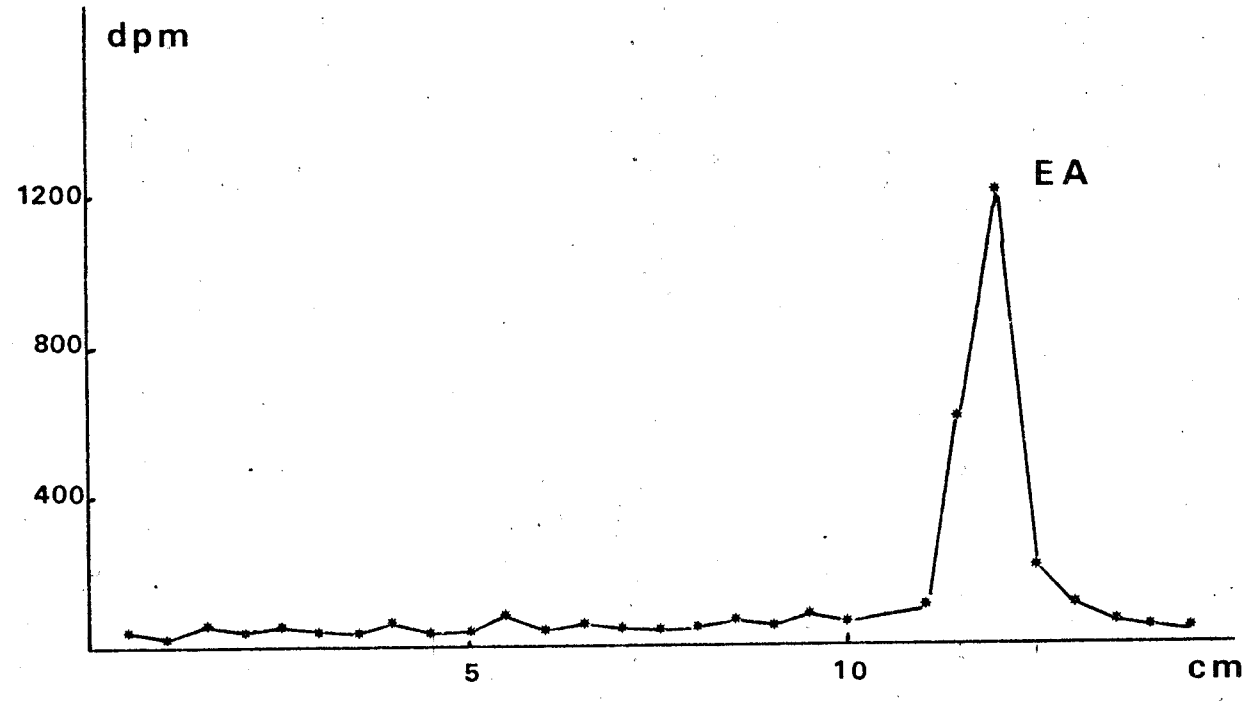
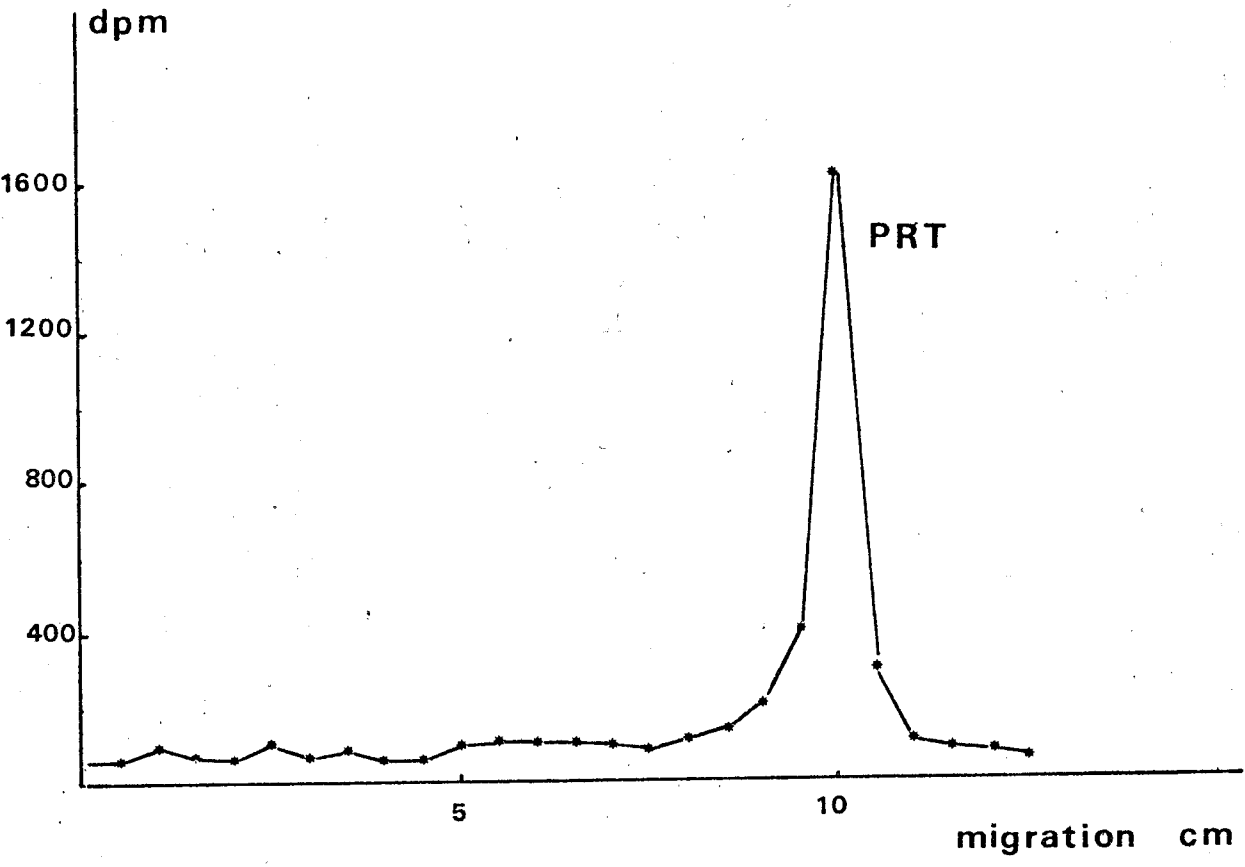
II - METABOLISATION PAR DES ENZYMES DE L'HEPATOCYTE DE RAT DE DEUX METABOLITES DE *P. roqueforti* -

Nous avons choisi d'étudier le métabolisme de PRT et EA par deux fractions cellulaires de l'hépatocyte de rat préalablement traité soit au phéno-bartital ou au méthyl-3 cholanthrène.

Nous avons préparé selon le processus décrit dans la partie expérimentale, le cytosol et les microsomes de l'hépatocyte de rat.

Pour faciliter notre étude, nous avons marqué au ^{14}C nos précurseurs EA et PRT. Ces métabolites marqués ont été obtenus par voie biosynthétique en fournissant au champignon de l'acétate de sodium ^{14}C . A deux fioles de culture de la souche B on ajoute, au 4ème jour, 0,1 mCi d'acétate de sodium ^{14}C (U). Les cultures sont extraites au 14ème jour. La purification par chromatographie sur silice permet de récupérer, après cristallisation, 3 mg de EA et 6 mg de PRT. Ces métabolites sont dosés quantitativement par chromatographie liquide. Le pureté radiologique a été vérifiée par C.C.M. (voir profils page ci-contre). On obtient ainsi :

$$\underline{\text{EA}} = 0,027 \text{ mCi/mmole} \quad \text{et} \quad \underline{\text{PRT}} = 0,037 \text{ mCi/mmole}$$



1° - METABOLISATION DE PRT -

L'incubation de PRT ^{14}C avec des microsomes en absence de NADPH résulte en l'apparition de 1 produit majoritaire comme le montre le profil en C.C.M..

Nous avons réalisé cette même incubation avec des quantités plus importantes dans le but d'isoler et de caractériser ce métabolite. Une expérience réalisée à partir de 20 mg de PRT après une heure d'incubation permet de récupérer après chromatographie sur silice par élution de gradient $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$, 7 mg de PRT et 9 mg d'un métabolite plus polaire 7. Ce métabolite est identique au composé obtenu par saponification de PRT (25). Le comportement chromatographique, le point de fusion (le point de fusion de mélange ne montre aucun abaissement notable), les spectres de masse se révèlent identiques chez le métabolite et le produit de synthèse.

L'incubation de PRT ^{14}C avec un mélange de cytosol et de microsomes en présence de NADPH résulte en l'apparition de deux métabolites différents de PRT : 2 et 9 (profil chromatographique page ci-contre). L'incubation réalisée avec 12 mg de PRT pendant deux heures permet de récupérer 8 (3 mg) et 9 (4 mg) après chromatographie sur silice.

Le composé 8 s'avère être identique à EC comme le montre le comportement chromatographique, le point de fusion et le spectre de masse ($M^+ = 322$). Le composé 9 est plus polaire que 8 et PRT. La structure proposée repose sur la comparaison avec le produit obtenu par action de $\text{KOH/CH}_3\text{OH}$ sur EC. Le métabolite naturel présente les mêmes caractéristiques chromatographiques et le même spectre de masse que le composé de synthèse.

Le composé de synthèse 9 a été obtenu de deux manières. La saponification de EC donne 9 avec un faible rendement. La réduction par NaBH_4 de 7 (142 mg) permet d'obtenir 9 (48 mg). Les données physiques et spectrales de 9 sont en accord avec la structure proposée cristaux blancs (PF 170°C décomposition).

I.R. (KBr) 3460 cm^{-1} et 3390 cm^{-1} (OH)
 1685 cm^{-1} (cétone α,β insaturée)

Le spectre de masse donne un ion moléculaire M^+ (280). L'analyse en haute résolution permet de proposer la formule brute $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5$ (calculé : 280, 13106 ; trouvé : 280, 13149).

Le spectre de R.M.N. du proton (90 MHz, CD_3OD) est complexe et suggère comme pour EC la présence d'un équilibre 9a 9b. Les pics H-9 à 5,95 ppm (9a) et 6,42 ppm (9b) permettent d'estimer à 75% la forme de 9b.

La métabolisation de PRT en présence du cytosol et de NADPH conduit uniquement au composé 2 comme le montre une simple analyse en C.C.M..

2° - METABOLISATION DE EA -

L'incubation de EA avec des microsomes en présence de NADPH permet de détecter la présence de trois métabolites plus polaires que EA. Dans l'ordre : 10, 8, 9.

Une métabolisation réalisée avec 20 mg de EA permet d'isoler, après une chromatographie sur silice, dans l'ordre 10 (3 mg), 8 (6 mg), 9 (7 mg).

Le composé 10 est identique au produit de saponification de EA (C.C.M., point de fusion, point de fusion de mélange et spectre de masse).

La saponification de EA (50 mg) conduit à l'isolement d'un composé cristallisé blanc 10 de point de fusion 128-130°. Les données spectrales sont parfaitement en accord avec la structure proposée.

Spectre U.V., λ_{max} 246 nm, $\epsilon = 13200$ (cétone α, β éthylénique)

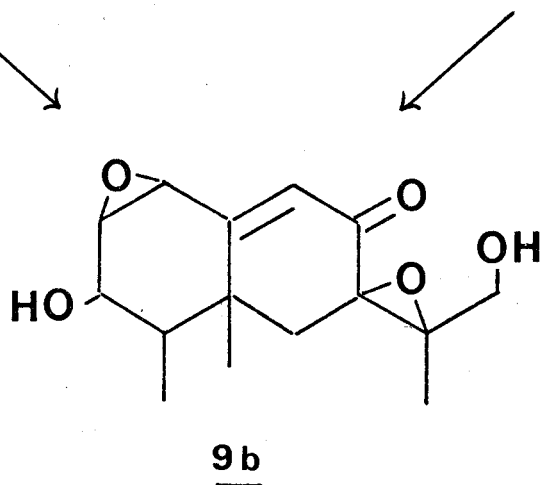
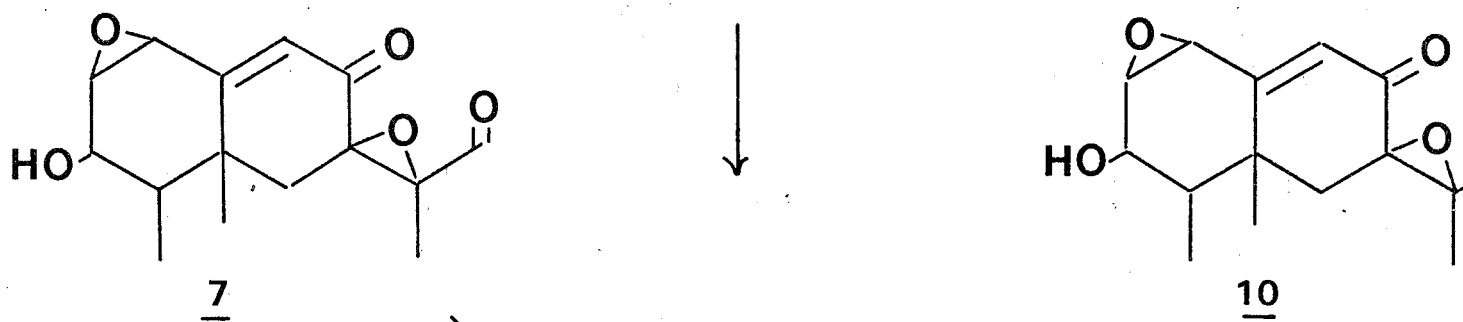
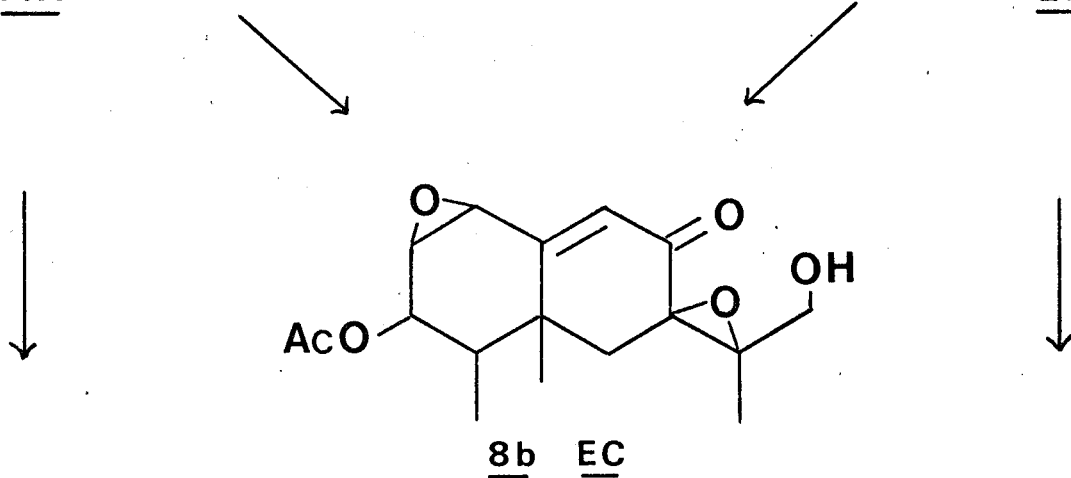
Spectre I.R. 3570 et 3510 cm^{-1} (OH)
1685 cm^{-1} (cétone α, β éthylénique)

Le spectre de masse donne un pic moléculaire à $M^+ = 264$. L'analyse en haute résolution ($M^+ = 264$, 13598) est en parfait accord avec la formule brute $C_{15}H_{20}O_4$ (calculé : 264, 13615).

Le spectre R.M.N. du proton (60 MHz) ne diffère du composé EA que par la disparition de la fonction acétate (à $\delta = 2,15$) et le déplacement paramagnétique du proton H-3 (de 5,12 ppm à 4,12 ppm).

Le composé 8 issu de cette métabolisation est identique à EC comme le montre le comportement chromatographique, le point de fusion, le point de fusion de mélange et le spectre de masse.

De même, le composé 9 (obtenu à partir de EA) se révèle identique au composé caractérisé précédemment dans la métabolisation de PRT (point de fusion et spectre de masse sont identiques).



BUS
LILLE

L'incubation de EA avec des microsomes en l'absence de NADPH conduit uniquement au composé 10.

L'incubation de EA, avec le cytosol ne provoque aucune métabolisation. Avec le surnageant à 15000g, la métabolisation est identique à celle des microsomes.

Ces résultats nous ont amenés à étudier la métabolisation par les microsomes hépatiques de EC. En absence de NADPH, l'incubation de EC (4 mg) conduit à l'obtention du composé 9 (1 mg) produit d'hydrolyse. Les caractéristiques chromatographiques et spectroscopiques (S.M.) de ces métabolites sont celles du composé 9 préalablement caractérisé. De même, la métabolisation de 7 par le cytosol mène en présence de NADPH à 9 et la métabolisation de 10 sur des microsomes en présence de NADPH conduit au composé 9. Dans ces deux dernières métabolisations, seule les caractéristiques chromatographiques des produits obtenus ont été utilisés pour confirmer leur nature.

La figure ci-contre résume donc l'ensemble de nos résultats. Le bilan de ces métabolisations fait apparaître l'existence de trois types de réactions :

- Une réaction d'hydrolyse d'ester (acétate)
- Une réaction de réduction d'un groupement carbonyle
- Une réaction d'hydroxylation.

La réaction d'hydrolyse de l'acétate se produit sur la fraction microsomale, en l'absence de NADPH. Une telle réaction conduit bien à un composé plus polaire, plus hydrophile, plus facilement éliminable. Ce type de réaction a déjà été rencontré dans le cas de la procaïne (61). Dans le cas des mycotoxines UENO a montré (63) que la T-2 toxine (Mycotoxine de fusarium de squelette sesquiterpénique de type trichothécane) subit également sur les microsomes une réaction de désacétylation. La réaction de réduction de la fonction aldéhyde est une réaction classique du cytosol de la cellule hépatique. Une telle réaction se produit par exemple au cours de la métabolisation hépatique de l'aflatoxine B₁ en Ro (62).

Dans notre cas, M. CACAN a montré, dans la publication jointe (Toxicology) qui détaille le fractionnement et l'isolement de systèmes enzymatiques étudiés, que cette activité réductase se retrouve également sur les microsomes. Il est très probable qu'il s'agit d'une contamination des microsomes par une enzyme cytosolique.

La réaction d'hydroxylation observée est très classique de la fraction microsomale. On peut remarquer, dans le cas qui nous intéresse, que le méthyle qui subit la réaction d'hydroxylation n'est pas le plus accessible stériquement de la molécule et que, sur le plan réactivité, les deux méthyles 12 et 13 doivent être équivalents.

L'orientation de l'hydroxylation en C-12 en *cis* par rapport à la fonction cétone α, β éthylénique peut suggérer, dans le site enzymatique, une interaction avec cette fonction. Il serait intéressant d'étudier, sur des modèles proches de EA, ce type de métabolisation.

Toutes les réactions impliquées ici conduisent bien à un caractère plus hydrophile des molécules. Sur le plan détoxication, l'étude des relations entre structure chimique et activité biologique montre bien que la réaction de réduction seule constitue dans notre cas un mécanisme de détoxication de PRT.

CACAN (64) a étudié l'étape suivante du processus de détoxication : la conjugaison. Elle a montré qu'il existe sur les microsomes hépatiques un enzyme (glucoronyl-transférase) capable de conjuguer EC et 9 à l'acide glucuronique. Cette liaison se fait très probablement sur l'hydroxyle en C-12 (les composés 1 et 4 ne sont pas conjugués dans ces mêmes conditions).

L'ensemble de ces études réalisées *in vitro* ne préjugent pas du mécanisme effectivement actif *in vivo*, mais elles constituent une approche souvent plus facile du problème.

IN VITRO METABOLISM OF *PENICILLIUM ROQUEFORTI* TOXIN (PRT) AND A STRUCTURALLY RELATED COMPOUND, EREMOFORTIN A, BY RAT LIVER

MONIQUE CACAN, SERGE MOREAU and ROGER TAILLIEZ

Unité INSERM U 42, Domaine du C.E.R.T.I.A., 59650 Villeneuve d'Ascq (France)

(Received March 17th, 1977)

(Revision received May 17th, 1977)

(Accepted June 14th, 1977)

SUMMARY

The metabolism of two closely related compounds (PRT and Eremofortin A) isolated from a culture of *Penicillium roqueforti* was studied in vitro using the rat liver system. Enzymatic activity was enhanced by treatment of rats with phenobarbital (PB) or 3-methylcholanthrene (MC). Metabolites were isolated by silica gel column chromatography and their structures elucidated by spectral analysis and confirmed by chemical synthesis.

Three types of enzymatic reactions were observed: hydroxylation, reduction and deacetylation; the metabolic pathways of the two compounds give the same final product. The authors suggest that the pathway described here is a route of detoxication.

INTRODUCTION

Penicillium roqueforti toxin (PRT) is a mycotoxin produced from cultures of *P. roqueforti*, a strain used in the ripening of French roquefort cheeses [1,2]. *P. roqueforti* has also been reported to be the main microorganism isolated from ground moldy mixed grains and corn silage associated with cases of bovine abortion [3]. Other metabolites such as Eremofortin A closely related structurally to PRT have been isolated in our laboratory from a unique strain of *P. roqueforti* [4].

The intraperitoneal (i.p.) lethal dose values of the pure toxin solubilized

Abbreviations: DMSO, dimethylsulfoxide; MC, 3-methylcholanthrene; PB, phenobarbital; PRT, *Penicillium roqueforti* toxin; TLC, thin-layer chromatography.

with dimethylsulfoxide (DMSO) have been calculated. Death occurred within 40 h after i.p. injection of 10 μ g of toxin/g to male Swiss mice (25–30 g). PRT inhibited to the extent of 60% the in vitro activity of *Escherichia coli* RNA polymerase at a dose of 40 μ g/ml of incubation medium [5]. On the other hand, Eremofortin A was not an inhibitor of *E. coli* RNA polymerase and was not lethal to Swiss mice up to an i.p. dose of 15 μ g/g [6].

The drug metabolizing enzyme system, inducible by phenobarbital (PB) or 3-methylcholanthrene (MC), not only metabolizes endogenous substrates such as steroids or fatty acids but also exogenous substances, e.g. drugs, carcinogens, mycotoxins [7,8]. We have studied and compared the metabolic patterns of PRT, the toxic compound, and Eremofortin A using rat liver subcellular preparations induced with PB or MC.

MATERIALS AND METHODS

Purification of PRT and Eremofortin A

The same strain of *P. roqueforti* (NRRL 349) was used for production of PRT and Eremofortin A. Culture conditions, isolation and purification have been previously described [4].

Preparation of labelled PRT

PRT was prepared biosynthetically with *P. roqueforti* using sodium ^{14}C acetate as a precursor (spec. act. 97 mCi/mmol, purchased from C.E.A.). It has been isolated and crystallized as described [4]. The purity of the toxin was verified by thin-layer chromatography (TLC) (Fig. 1A) using as solvent chloroform–methanol (96 : 4) and the chemical identity of the compound was checked by its co-chromatographic behavior with standard PRT.

Microsomal preparations

Male rats (Wistar strains) weighing about 250 g were used for the experiments. They received an i.p. injection of MC (20 mg/kg dissolved in corn oil) or of PB (60 mg/kg dissolved in 0.154 M NaCl) once a day for three consecutive days before killing. Livers were homogenized in 3 vols. of ice-cold 150 mM KCl and centrifuged at 4°C for 20 min at 15 000 g. The pellets were discarded and the postmitochondrial supernatants removed and centrifuged for 90 min at 200 000 g (Rotor 60 Ti, Beckman). The cytosol (S 200 000 g) was kept and the microsomal pellets were washed twice with the following medium: Tris–HCl 10 mM pH 7.4 containing 0.5 mM MgCl_2 and 0.25 M sucrose. Microsomes were resuspended in this latter buffer and stored in liquid nitrogen. The amount of protein in the microsomal fraction was determined by the method of Lowry et al. [9] using bovine serum albumin as standard.

Incubation procedure

Incubations were carried out in glass conical flasks, open to air, at 37°C

with gentle shaking during 1 or 2 h. The reaction mixture in 6.5 ml of Tris-HCl buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 mM MgCl₂, 0.25 M sucrose) contained 5 mg of proteins and in some experiments 5 μM NADPH₂ (Boehringer). PRT, [¹⁴C]PRT or Eremofortin A (1.5 μM in 20 μl methanol) was added just before incubation.

Purification and production of metabolites

The reactions were stopped by addition of 30 ml of cold chloroform and the metabolites were extracted three times with 30 ml of chloroform. The pooled chloroform soluble fractions were treated with anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The products were dissolved in chloroform and analyzed by TLC on silica gel coated plates, using CHCl₃-MeOH (96 : 4) as solvent. After spraying with concentrated sulfuric acid, the fluorescent spots were visualized under UV light. When labelled PRT was the substrate of the reaction, silica gel precoated aluminium sheets were used and 0.5-cm bands were cut along the chromatographic path. Each band was counted in toluol based scintillation medium.

Production of metabolites was performed by incubating 20 mg of PRT or Eremofortin A in the appropriate reaction mixture. After concentration, the metabolites were isolated on silica gel column chromatography using a stepwise gradient mixture of MeOH-CHCl₃ (0 : 100 to 20 : 80), then purified by crystallization.

Chemical structures of metabolites

Metabolites structures have been studied in our laboratory by spectral analysis and chemical synthesis [10]. They are reported in Fig. 2.

RESULTS

Enzymes involved in the metabolism of PRT and Eremofortin A

The intracellular localization of the enzyme systems affecting PRT and Eremofortin A metabolism was established by testing the various subcellular fractions obtained by differential centrifugation. When Eremofortin A was used as substrate, the enzyme activity present in the whole homogenate of liver could be recovered in the 15 000 g supernatant and this activity could be recovered again in the 200 000 g microsomal pellet even when this pellet was washed twice then purified by high speed centrifugation. If PRT was the substrate (Table I), the homogenate, the S 15 000 g fraction or the mixture of 200 000 g supernatant, microsomal fraction were needed to metabolize PRT. Heating enzyme preparations in boiling water for 15 min resulted in the complete loss of activity. An enhanced activity was observed by treatment of rats with MC or PB. These observations allow us to presume an involvement of the drug metabolizing enzyme system.

The data presented indicate that two enzyme systems, one in the microsomal pellet and one in the 200 000 g supernatant, are required for the transformation of PRT whereas the microsomal fraction catalyzes the formation of Eremofortin A metabolites.



TABLE I
REQUIREMENTS FOR METABOLISM OF PRT

The reaction mixtures contained the appropriate liver preparation and the assays were made as described in Materials and Methods.

Liver preparation	NADPH ₂	Substrate	Production of		
			PRT Alcohol	Eremofortin C	Eremofortin C alcohol
15 000 g supernatant	0	PRT	+	-	-
Microsomes	0	PRT	+	-	-
Microsomes + N ₂	0	PRT	+	-	-
Boiled microsomes (100°C, 15 min)	0	PRT	-	-	-
Microsomes	+	PRT	+	+	+
200 000 g supernatant	+	PRT	-	+	-
200 000 g supernatant + N ₂	+	PRT	-	+	-
Boiled 200 000 g supernatant (100°C, 15 min)	+	PRT	-	-	-
200 000 g supernatant + microsomal fraction	+	PRT	-	+	+
Microsomes	0	Eremofortin C	-	-	+
200 000 g supernatant	+	PRT alcohol	-	-	+

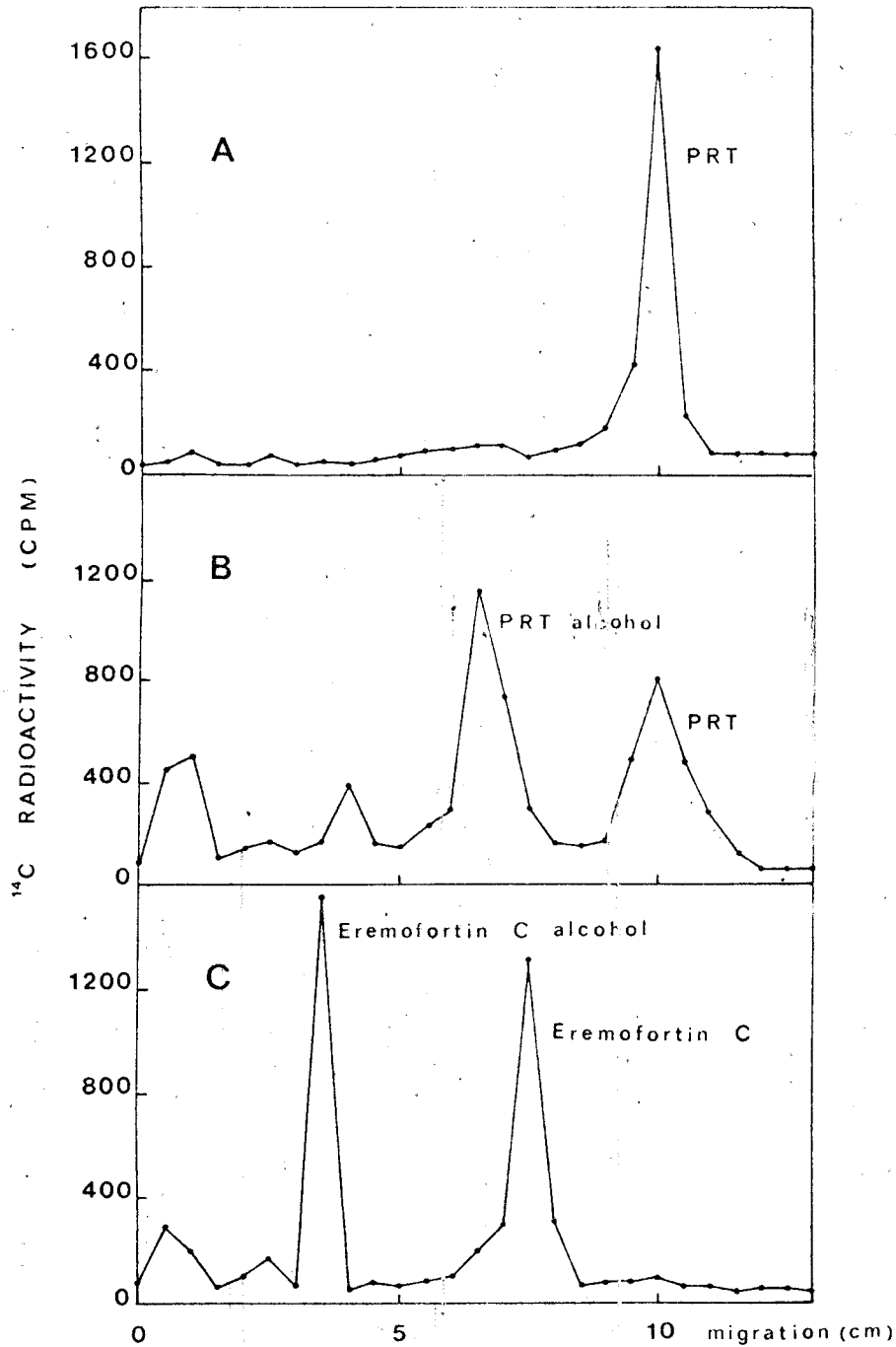


Fig. 1. Chromatographic profiles of labelled PRT and its metabolites. A: Labelled PRT before metabolization; B: Assay made in the standard conditions with microsomal proteins for a 60-min incubation time at 37°C of labelled PRT; C: Conversion of labelled PRT to Eremofortin C and Eremofortin C alcohol when NADPH₂ was added to the reaction mixture (200 000 g supernatant and microsomal fraction). Incubation was run 2 h at 37°C.



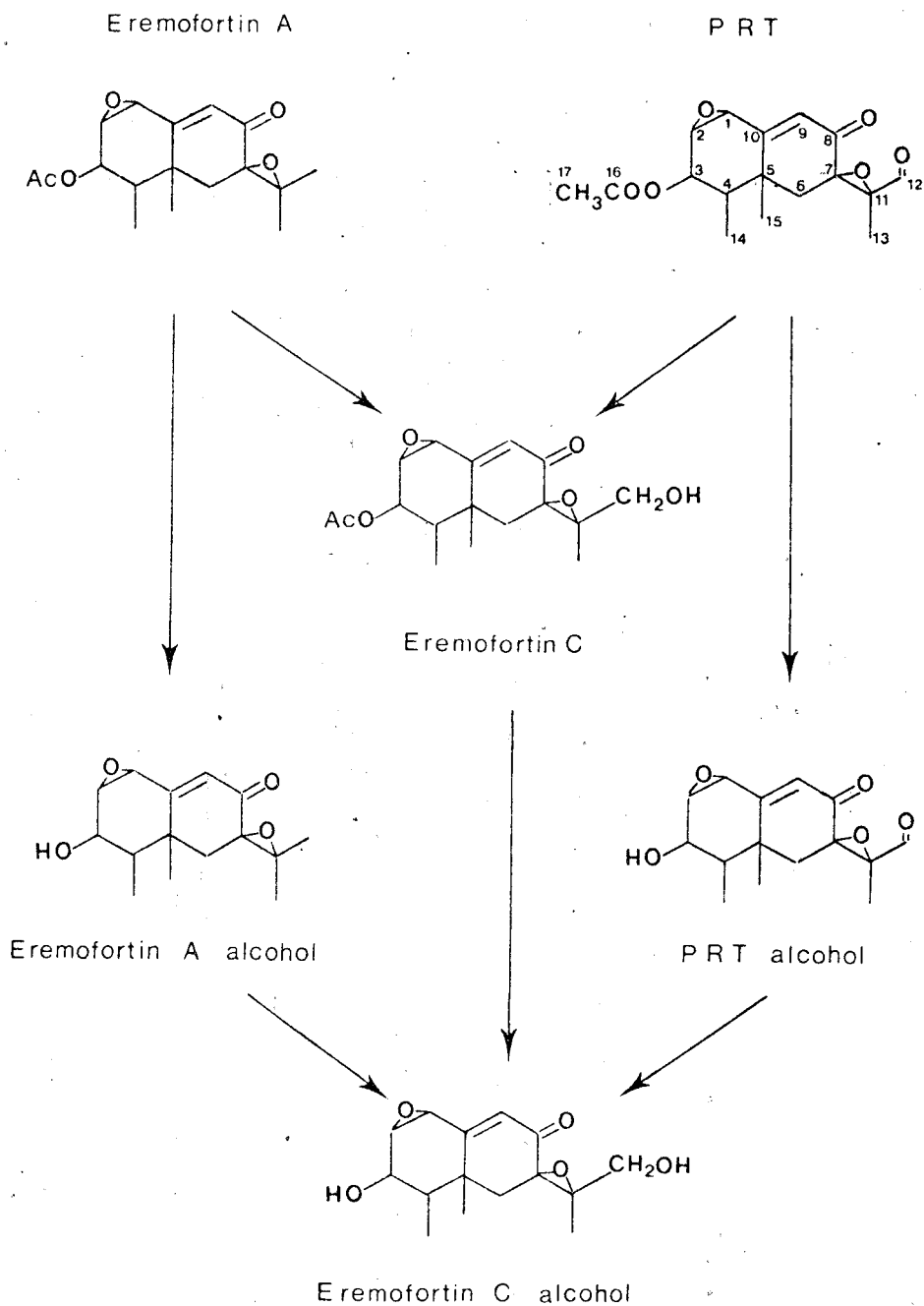


Fig. 2. Proposed pathways of Eremofortin A and PRT metabolism by rat liver preparations. †, Metabolism requiring microsomal enzymes without NADPH₂; ‡, metabolism requiring NADPH₂ and microsomal enzymes; ✓, metabolism requiring NADPH₂ and 200 000 g supernatant.



Metabolism of PRT

The metabolism of PRT by microsomes did not require NADPH₂ and a main metabolite, PRT alcohol, appeared (Fig. 1B). Incubation of PRT with NADPH₂ and the 200 000 g supernatant gives a product identified as Eremofortin C. The incubation of PRT with a mixture of 200 000 g soluble fraction and microsomal pellet, in the presence of NADPH₂, resulted in the appearance of two compounds, Eremofortin C and Eremofortin C alcohol (Fig. 1C).

Metabolism of Eremofortin A

We report qualitative studies for this compound. Results were similar to those obtained with PRT. Eremofortin A alcohol first appeared when we incubated Eremofortin A with microsomes. The addition of NADPH₂ in the incubation medium catalyzed the formation of two compounds. TLC studies and spectral data indicated they were identical to Eremofortin C and Eremofortin C alcohol (Fig. 2).

Metabolism of Eremofortin C

Eremofortin C, the hydroxylated product of Eremofortin A or the reduced form of PRT was metabolized by rat liver microsomes. Its metabolism did not require NADPH₂ and the only product of the reaction was identified as Eremofortin C alcohol, based upon its chromatographic behavior, enzymatic requirements and spectral data [10] (Fig. 2).

Metabolism of PRT alcohol and Eremofortin A alcohol

The metabolism of PRT alcohol requires NADPH₂ and the 200 000 g supernatant, whereas the metabolism of Eremofortin A alcohol requires NADPH₂ and the presence of microsomal enzymes (microsomal pellets). In each case the product of the reaction was identified as Eremofortin C alcohol (Fig. 2).

DISCUSSION

The experimental data indicate the occurrence of an O-deacetylase in rat liver microsomes which is involved in the metabolism of PRT, Eremofortin A and Eremofortin C. This type of enzyme has already been noted by Remmer and Merker [11] using procaine as the substrate.

Eremofortin A hydroxylase is localized in the microsomal fraction and requires NADPH₂ and O₂, but the supernatant of the microsomal pellet contains a reductase which catalyzes the reduction of PRT and of PRT alcohol. Both microsomal and cytosol enzymes are required for the formation of Eremofortin C alcohol. It has been observed previously [12] that a similar type of system, a microsomal hydroxylase and a cytoplasmic reductase, is required for the formation of aflatoxicol H₁, a metabolite of aflatoxin B₁, the potent hepatocarcinogen produced by some strains of *Aspergillus flavus*. It should be noted that after two or even three resuspensions and subsequent washings of the microsomal fraction, a weak but detectable

reductase activity is always associated with the 200 000 g pellet suggesting that this latter enzyme might be distributed between the cytosol and the microsomes.

It is to be noted that the metabolic pathways of PRT and the non-toxic Eremofortin A are similar (Fig. 2). Since Eremofortin A is not toxic in vivo as well as in the system described by Moulé et al. [5,6], we can suggest that the pathway obtained in our in vitro system is a route of detoxication. PRT and Eremofortin A are epoxides but are not substrates of epoxide hydrase, an important drug metabolizing enzyme [13].

Toxicity tests of the metabolic products are under investigation. Additional studies of PRT on isolated perfused rat liver and in the animal are needed to determine whether the pathways we have depicted closely reflect the in vivo metabolism and whether the hydroxylated compound, Eremofortin C alcohol, could be conjugated with glutathione or glucuronic acid in order to increase its hydrophilicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

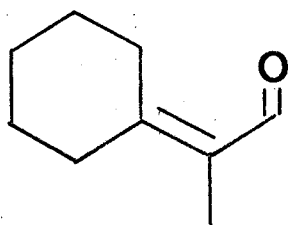
The authors thank Dr. J. Krembel for his interest in this study and Miss M. Dhérin for technical assistance.

REFERENCES

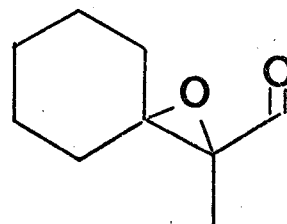
- 1 R.D. Wei, P.E. Still, E.B. Smalley, H.K. Schnoes and F.M. Strong, *Appl. Microbiol.*, 25 (1973) 111.
- 2 R.D. Wei, H.K. Schnoes, P.A. Hart and F.M. Strong, *Tetrahedron*, 31 (1975) 109.
- 3 P.E. Still, et al., *Fed. Proc.*, 31 (1972) 733.
- 4 S. Moreau, A. Gaudemer, A. Lablache-Combier and J. Biguet, *Tetrahedron Letters*, 11 (1976) 833.
- 5 Y. Moulé, in *Les Colloques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Les mycotoxines*, 46 (1975) 93.
- 6 S. Moreau, Y. Moulé and J.F. Bousquet, in *3e Symposium International I.U.P.A.C. sur les mycotoxines dans l'alimentation*, Paris, 16-18 septembre 1976.
- 7 A.H. Conney, *Pharmacol. Rev.* (1967) 317.
- 8 A. Sarasin and Y. Moulé, *FEBS Lett.*, 32 (1973) 347.
- 9 O.H. Lowry, H.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 10 S. Moreau, M. Cacan and A. Lablache-Combier, *J. Org. Chem.* (1977) 2632.
- 11 H. Remmer and H.J. Merker, *Science*, 142 (1963) 1657.
- 12 A.S. Salhab and D.P.H. Hsieh, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 10 (1975) 419.
- 13 F. Oesch, *Xenobiotica*, 3 (1973) 305.

SYNTHÈSES CHIMIQUES

Les relations structures-activités de la série des éremofortines ont montré le rôle prépondérant de la fonction aldéhyde. Néanmoins, on peut penser que les autres fonctions, le squelette participent à l'effet toxique, en modifiant la réactivité de la fonction aldéhyde ou son environnement stérique. Nous avons, dans ce but, tenté de synthétiser quelques aldéhydes simples présentant avec PRT des analogies, mais ne comportant pas tous les groupements fonctionnels. Nous avons choisi les aldéhydes suivants : 11a et 12a et les alcools correspondant 11b et 12b.

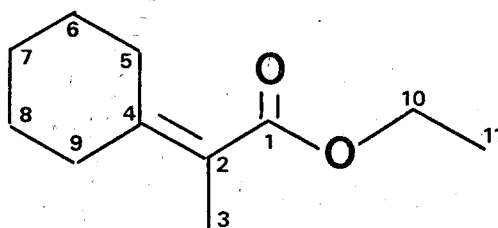


11a

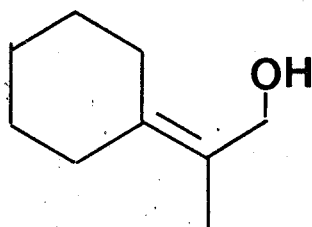
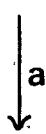


12a

Le schéma de synthèse est le suivant : l'ester insaturé 13 permet d'accéder rapidement aux composés 11 et 12 selon la séquence :

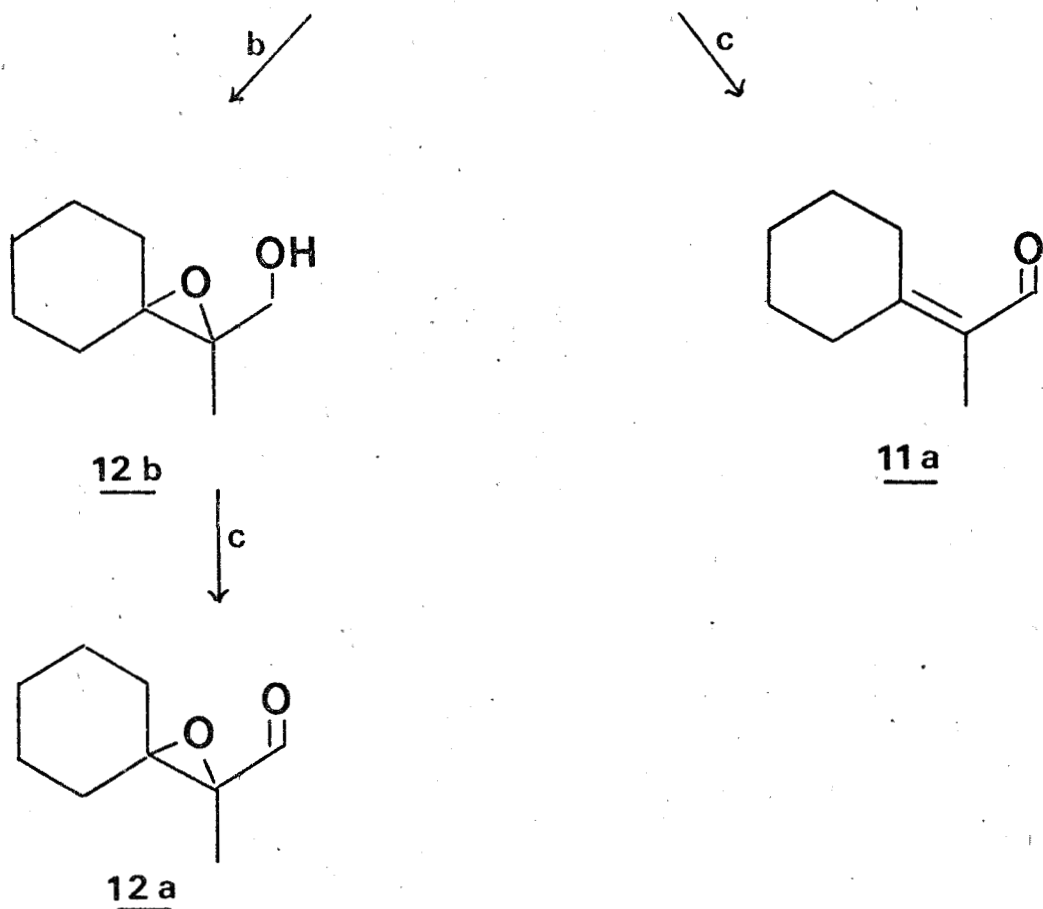


13

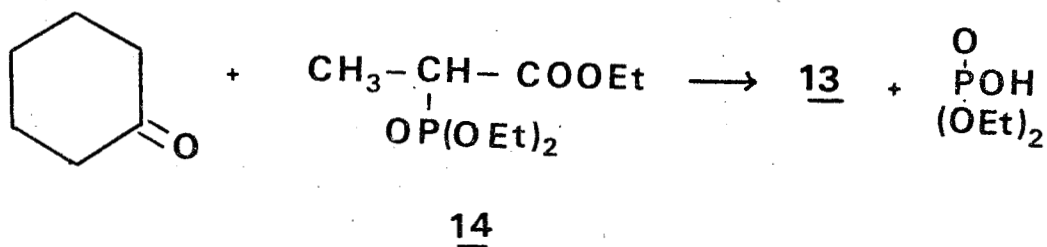


11b

11b



La synthèse de l'ester de départ est effectuée par une réaction de WITTIG-HORNER sur la cyclohexanone

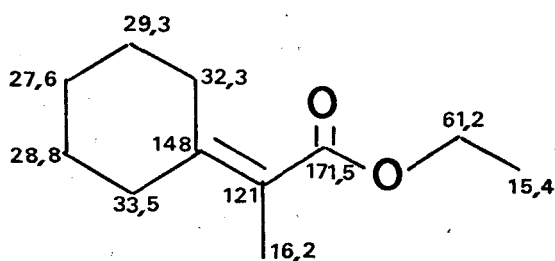


En effet, l'anion correspondant à l'espèce 14 est beaucoup plus réactif que la phosphine correspondante et permet d'obtenir avec un bon rendement un ester insaturé (57).

L' α diéthylphospho-propionate d'éthyle 14 est préparé à partir de l' α -Bromopropionate d'éthyle par action du phosphite d'éthyle (58).

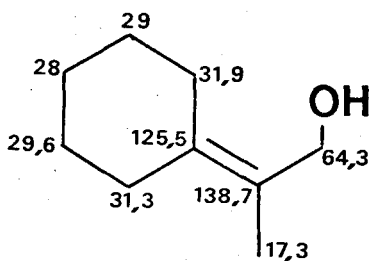
Le carbanion de 14 est préparé dans l'éthanol absolu par action de l'éthanolate de sodium. Ce carbanion est condensé sur la cyclohexanone. Après distillation, on obtient 13 (liquide incolore Eb 85° à 0,7 mm) avec un bon rendement (60%).

Le spectre I.R. indique la présence d'une fonction ester insaturée (1715 cm⁻¹). Le spectre R.M.N. du proton un triplet (3H) à $\delta = 1,25$, un singulet large $\delta = 1,8$ (3H, méthyle sur double liaison), un quadruplet (2H) à $\delta = 4,1$. Le spectre R.M.N. ¹³C présente 11 pics. Les valeurs observées sont en accord avec la structure attendue.



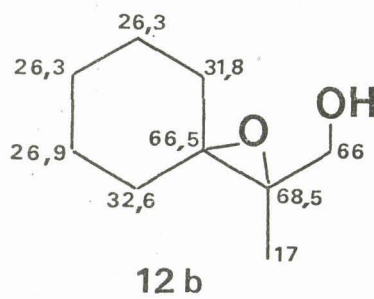
13

La réduction de 13 par LiAlH₄ donne 11b caractérisé par une absorption en I.R. à 3600 et 3450 cm⁻¹ et par la présence dans son spectre R.M.N. 'H d'un singulet large à $\delta = 1,8$ ppm d'intensité 3H (méthyle sur double liaison) et d'un autre singulet à $\delta = 4,2$ ppm d'intensité 2H (CH₂OH), 1H échangeable avec D₂O à $\delta = 3$ ppm (O-H). Le spectre R.M.N. ¹³C présente 9 pics dont les valeurs sont :



11 b

11b est oxydé par l'acide m.chloroperbenzoïque en époxyde 12b liquide incolore caractérisé en I.R. par une bande hydroxyle à 3610 et 3440 cm^{-1} , en R.M.N. ^1H par un méthyle singulet à 1,5 ppm, 1H (s, large échangeable avec D_2O) à 3,6 ppm, un singulet (2H) à 3,7 ppm ($-\text{CH}_2-\text{OH}$) et surtout en R.M.N. ^{13}C par deux pics à 68,5 et 66,5 ppm caractéristique des carbones époxydiques.



L'oxydation de 11b en aldéhyde est réalisée par l'action de MnO_2 dans l'hexane. Le brut de réaction (après 48 heures) est filtré sur une colonne de silice, puis purifié par chromatographie liquide haute performance. Le rendement après purification est de 36%. L'aldéhyde 11a est un liquide incolore caractérisé en I.R. par une absorption de 1680 cm^{-1} et en RM.N. ^1H par un proton aldéhydique à $\delta = 10$ ppm (non échangeable avec D_2O), et un méthyle sur double liaison à 1,75 ppm.

L'oxydation de 12b en 12a est réalisée dans les mêmes conditions. Le rendement obtenu après purification par chromatographie liquide est de 40%. 12a est un liquide incolore qui présente en I.R. une bande carbonyle à 1720 cm^{-1} , en R.M.N. ^1H , un proton aldéhydique à 9,4 ppm et un méthyle à 1,41 ppm.

L A B O T R Y O D I P L O D I N E

--0000000--

BOTRYODIPLODINE UNE MYCOTOXINE
ÉLABORÉE PAR UNE SOUCHE DE *P. roqueforti*

Nous avons examiné de manière systématique la production de métabolites par diverses souches de *P. roqueforti* en nous intéressant plus particulièrement aux souches isolées de sources naturelles.

J. PELHATE, au cours d'études sur l'évolution de la flore fongique des ensilages, isole très fréquemment des souches de *P. roqueforti*. Il nous a aimablement fourni ses divers isollements. De la cinquantaine de souches examinées de diverses origines (maïs, fourrage, blé fourragé, pulpe de betterave, paille humide, soja, fèves), nous avons retenu une souche non productrice des sesquiterpènes que nous venons d'examiner. La souche B-26 (isolée de maïs fourragé ensilé) montre à l'examen en C.C.M. son aptitude à élaborer de nouveaux métabolites. Après avoir constaté que l'extrait chloroformique de la culture de B-26 était toxique pour la souris, nous avons jugé opportun d'entreprendre la purification et l'étude de ces métabolites.

Au préalable, toutefois, nous avons tenu à vérifier soigneusement la nature de cette souche. Dans cette intention, un clone de l'isolement original a été confié au Centraalbureau Voor Schimmelcultuur à BAARN (Pays-Bas). Ce clone fut effectivement identifié comme un *P. roqueforti* Thom.

Les conditions de culture de la souche B-26 sont identiques à celles utilisées pour la souche NRRL 849. L'extrait chloroformique réalisé au 14ème jour de culture (3g à partir de 50 fioles) est chromatographié sur une colonne de silice. L'élution avec des mélanges $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ de 1, 2, 5, 10% en CH_3OH permet de récupérer 4 fractions grossières. Des poids identiques (~ 10 mg) des diverses fractions (1, 2, 5 et 10%) sont injectés à trois souris (Swiss mâle, 20g) par voie intrapéritonéale dans 0,1 ml de DMSO. Dans ces conditions, seule



la fraction 2% est toxique : (les trois souris sont mortes en 40 heures). A l'examen en C.C.M. de cette fraction, une tache majoritaire apparaît en brun rouge après pulvérisation à l'acide sulfurique et chauffage à 110° pendant 20 minutes. Nous avons donc entrepris l'isolement et la caractérisation de cette tache.

- Purification et structure de la toxine 16 -

Un extrait chloroformique brut (2,2g) du milieu de culture de *P. roqueforti* B-26 est chromatographié sur colonne de silice (200g) éluée par 500 ml de mélanges $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ de 0, 0,5, 1, 2, 5% en CH_3OH . Le mélange à 2% élue une fraction homogène (850 mg) en C.C.M. qui contient la tache précédemment repérée.

Cette fraction est soumise à une chromatographie liquide haute performance préparative sur une colonne de silice (5-20 μm) de 30 cm de longueur et 2 cm de diamètre. L'élution est réalisée par un mélange hexane/acétate d'éthyle (30/70) à 9,9 ml/mn. La détection par un réfractomètre différentiel permet de déceler un pic élué au bout de 20 minutes correspondant à la tache repérée en C.C.M.. On obtient 60 mg d'un composé incolore qui cristallise très difficilement dans l'éther éthylique à froid (10 mg). L'étude structurale a été réalisée par diffraction de R.X.. La difficulté de cristallisation du produit naturel 16 nous a incités à réaliser cette étude sur un dérivé acétylé, le spectre I.R. de 16 indiquant la présence d'un hydroxyle. L'acétylation pyridinique conduit à l'obtention d'un composé 17 qui, soumis à une cristallisation dans un mélange éther éthylique - hexane, se présente sous la forme de plaquettes de dimensions suffisantes pour une étude en diffraction de R.X.. Pour des raisons de stabilité du produit, cette mesure a été réalisée à basse température dans l'obscurité.

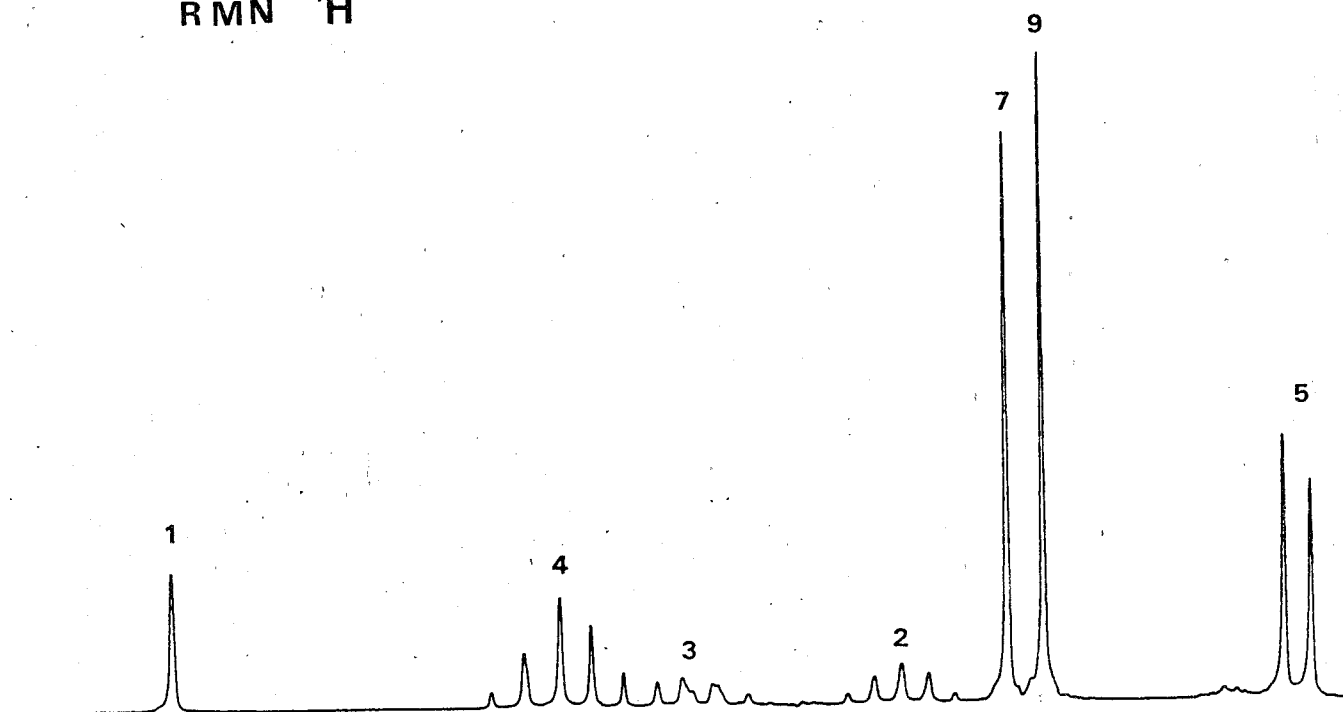
- Structure de 17 -

L'enregistrement de 1643 réflexions a été réalisé au diffractomètre automatique équipé d'une cathode au cuivre. La structure a été résolue par les méthodes directes.

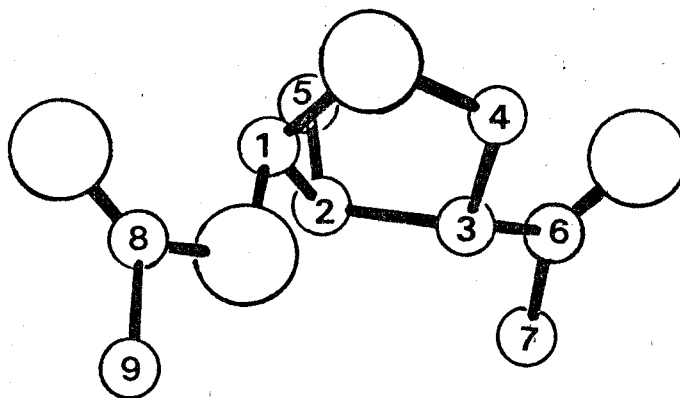
La maille est monoclinique. Ses paramètres sont en Å : $a = 14,192$, $b = 10,300$, $c = 6,535$. Les angles $\delta = \beta = 90^\circ$, $\beta = 102,25^\circ$.

Le groupe spatial est P_{21} .

RMN ^1H



La structure est indiquée ci-dessous :



Il s'agit d'un cycle à 5 éléments comportant une fonction hémiacétalique.

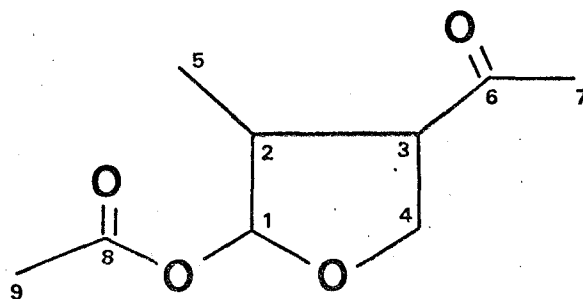
La fonction acétate est en trans par rapport au méthyle et à la méthyle cétone.

Les caractéristiques spectrales de 17 confirment cette structure.

Le spectre I.R. relève la présence de la fonction acétate (1735 cm^{-1}) et de la cétone (1720 cm^{-1}).

Le spectre R.M.N. ^1H (voir ci-contre) est aisément interprétable.





- $\delta = 0,92$ ppm 3H, d, $J = 7,5$ Hz CH_3 -5
- $\delta = 2,06$ ppm 3H, s, CH_3 -9
- $\delta = 2,23$ ppm 3H, s, CH_3 -7
- $\delta = 2,7$ ppm 1H, q; $J = 7,5$ Hz H-2
- $\delta = 3,8$ ppm 1H, m, H-3
- $\delta = 4,22$ ppm 1H, m, H-4
- $\delta = 5,95$ ppm 1H, s, H-1

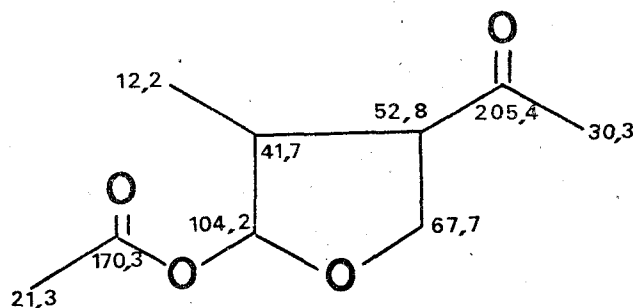
L'analyse des couplages H-3, H-4 et H-3, H-2 est difficile. Une mesure à haut champ serait nécessaire pour obtenir un spectre du premier ordre. Le proton H-1 singulet présente donc une constante de couplage nulle avec H-2.

L'irradiation de CH_3 -5 transforme le quintuplet H-2 en doublet.

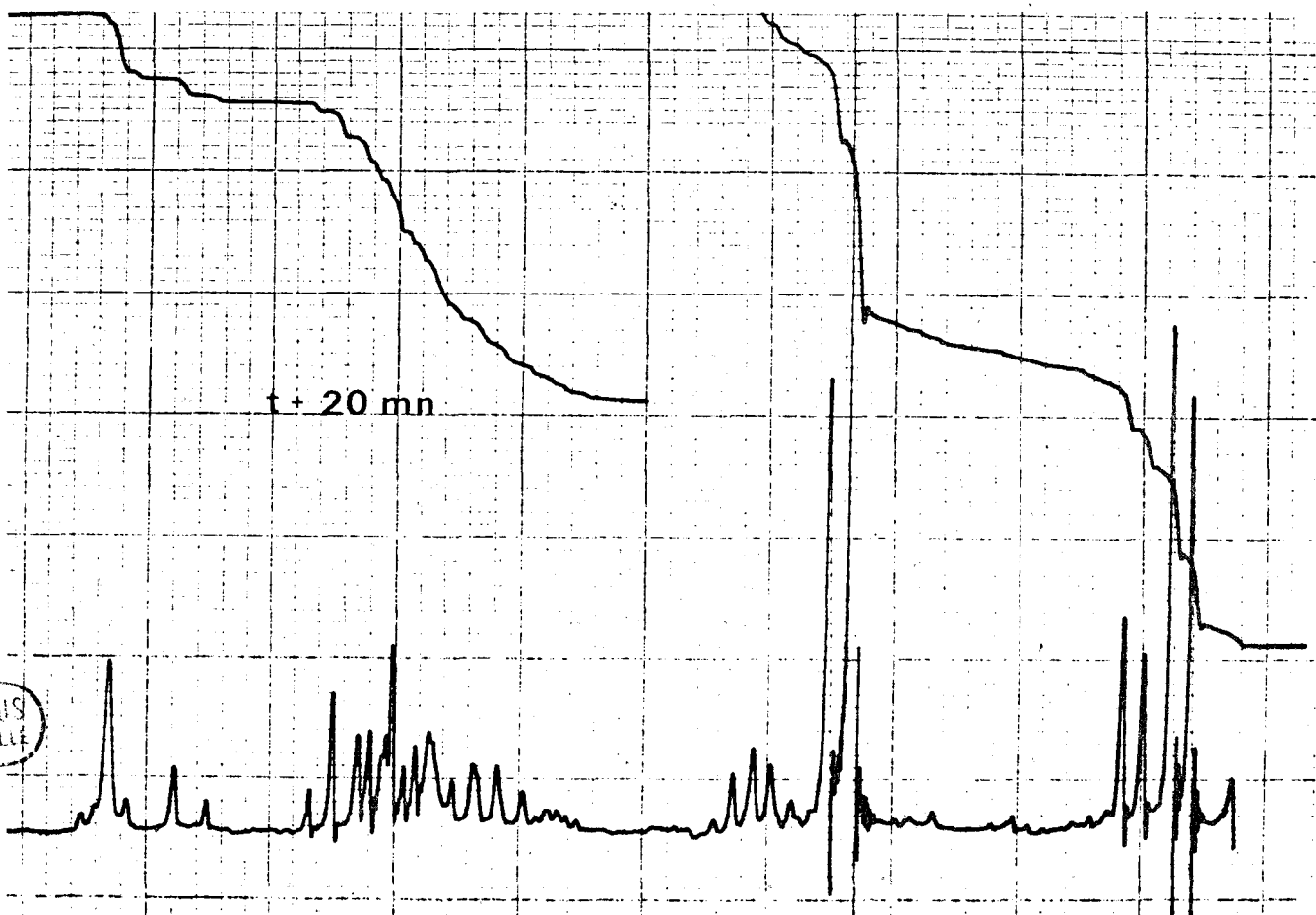
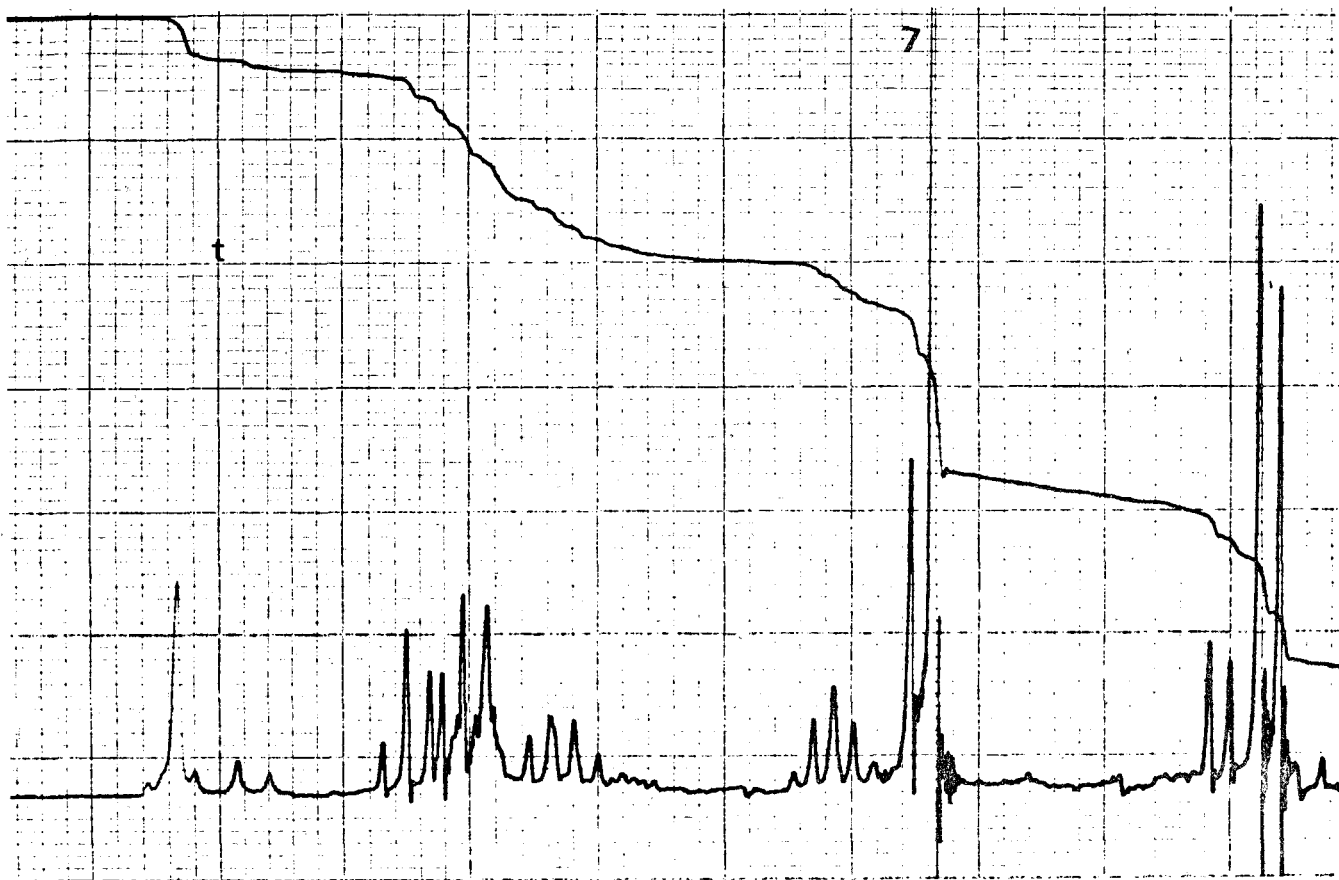
L'irradiation à 2,7 ppm (H-2) transforme le signal de CH_3 -5 en singulet, et perturbe l'allure du signal H-3. Le singulet de H-1 n'est lui pas perturbé dans cette mesure.

De même, l'irradiation en H-3 perturbe les deux signaux de H-2 et H-4 et l'irradiation en H-4 perturbe seulement le signal de H-3.

Le spectre R.M.N. ^{13}C (15,2 MHz) est constitué de 9 raies bien distinctes. Les multiplicités observées dans le spectre off-resonance permettent une attribution des différentes valeurs.



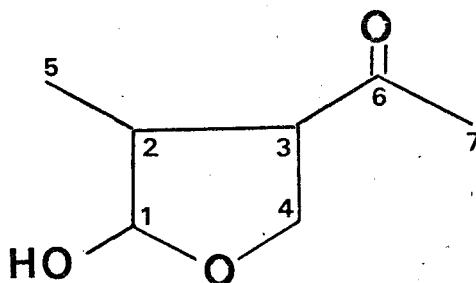
RMN ¹H de la Botryodiplodine 16



Le spectre de masse ne montre pas le pic moléculaire à m/e 186, mais un pic à $M-60$ $m/e = 126$ (perte de l'acétate), les fragmentations importantes sont m/e 98, 87, 85, 83.

- Structure de 16 -

L'examen des caractéristiques spectrales de 16 permet de proposer la structure :



Le proton hémiacétalique H-1 résonne à 5,15 ppm sous la forme d'un singulet.

La présence en solution d'un mélange de deux anomères peut expliquer la complexité du spectre R.M.N. ^1H , ainsi que son évolution dans le temps. L'anomère qui comporte un hydroxyle en cis par rapport à la méthyle cétone peut présenter une liaison hydrogène intramoléculaire qui est certainement à l'origine des différences de déplacements chimiques importants aux niveaux des CH_3 -7 et CH_3 -5.

L'acétylation de 16 conduit à un produit unique, on ne bloque pas acétylation qu'une des formes possibles. La liaison hydrogène intramoléculaire de la forme cis, rend l'hydroxyle moins accessible à l'acétylation. On déplace l'équilibre vers la forme trans qui est la seule isolée au niveau de 17.

L'examen de la littérature a montré que le composé 16 a été isolé pour la première fois d'un autre champignon *Botryodiplodia theobromae* (81). Les caractéristiques spectrales de 16 sont identiques à celle de la Botryodiplodine (81).

En conclusion, à cette étude structurale il faut mentionner que le composé 16 ne semble pas stable en phase aqueuse. Des solutions aqueuses réalisées par addition de 1 mg de 16 (dissous dans 20 μ l d'acétone) dans 1 ml d'eau prennent en une dizaine d'heures une coloration rose qui devient au bout de quelques jours rouge foncé. On ne peut alors réisoler 16 par extraction chloroformique. Ceci est à rapprocher de l'apparition dans le milieu de culture de B-26 d'un pigment rouge identique à partir du 12^{ème} jour au 13^{ème} jour de culture, et peut, peut-être, expliquer les difficultés rencontrées pour obtenir des quantités appréciables de 16.

C O N C L U S I O N

--0000000--

Penicillium roqueforti s'avère capable d'élaborer des métabolites toxiques de structures très différentes. La PR toxine PRT est un sesquiterpène de la série érémophilane. On peut isoler également, de certaines souches de *P. roqueforti*, d'autres métabolites de la même série biogénétique EA, EB, EC, ED, EE. Tous ces composés nous ont aidés à comprendre à la fois la biogénèse de PRT et son mode d'action. Les propriétés biologiques de PRT résultent de la présence de la fonction aldéhyde tant en ce qui concerne sa toxicité que les altérations biochimiques que PRT peut induire : inhibition de la réplication, transcription et traduction, création de pontages entre ADN et protéines de la chromatine.

Si la fonction aldéhyde est de toute évidence indispensable à cette activité, qui est particulièrement élevée pour un composé de type de PRT, nous n'avons aucune explication à donner pour cette particularité. Le processus de détoxification par des enzymes de l'hépatocyte de rat fait appel à une réduction de la fonction aldéhyde en alcool et à une conjugaison à l'acide glucuronique de cette même fonction.

La botryodiplodine est élaborée par une des souches à notre disposition. Sa structure qui comporte un squelette carboné à 7 atomes de carbones est très différente de PRT. Son origine biogénétique reste à préciser. L'étude toxicologique est en cours.

La production de ces deux toxines par diverses souches de *P. roqueforti* pose le problème de leurs présence dans les produits fromagés affinés par cette espèce et donc des risques toxigènes qu'ils font courir aux consommateurs.

En ce qui concerne PRT, ce risque est nul et repose sur des arguments que nous allons passer en revue.

Certes, les souches utilisées en fromageries sont capables d'élaborer dans les conditions du laboratoire la PR Toxine. La souche NRRL 849, la souche B, et également de nombreuses souches isolées de divers fromages du type bleu de tous pays (75) sont toxigènes.

Mais cette première et indispensable condition ne suffit pas. Encore faut-il que les souches toxigènes élaborent effectivement le toxique dans le milieu de culture que constitue la pâte à fromage et dans les circonstances de sa

transformation jusqu'au produit affiné. Il est encore nécessaire que tout au long de cette évolution le toxique ne soit pas détruit. Or l'élaboration de PRT n'est pas évidente comme le démontre une première étude de P. GALZY (76). Pour cet auteur, des cultures immergées de *P. roqueforti* dans un milieu favorable à la production de PRT n'en élabore pas, bien que le champignon se développe abondamment. L'aération semble insuffisante pour assurer la synthèse de la mycotoxine. De plus une trop faible teneur en saccharose (1,5%) empêche sa production. Enfin, la présence de NaCl (10%) est également inhibitrice. Or ces conditions défavorables sont réunies dans la préparation des fromages de type bleu : aération faible, absence de glucide et présence de NaCl. Ce travail de GALZY a été confirmé par des auteurs italiens (75) qui concluent également au défaut probable de PRT dans les fromages fermentés avec *P. roqueforti*.

Qui plus est P.M. SCOTT (54) a fait la preuve que PRT est instable dans le fromage et que son addition à un fromage conduit à la formation de PR imine dont nous avons démontré l'atotoxicité. La stabilité de ce composé dans le fromage n'excède d'ailleurs pas 5 jours. Comme l'activité protéolytique de *P. roqueforti* libère de l'ammoniaque, de la PR imine est produite à partir de PRT ajoutée.

Tels sont les principaux arguments qui justifient que l'on n'éprouve aucune inquiétude quant à l'innocuité des fromages bleus.

En ce qui concerne la Botryodiplodine, peu de données sont disponibles. Néanmoins, on peut à son sujet développer deux arguments rassurants. D'abord les souches qui l'élaborent semblent rares puisque, au cours de notre travail, nous n'en avons rencontré qu'une seule qui, d'ailleurs, n'a pas été isolée d'un produit laitier. Ensuite, la toxine est instable en phase aqueuse. Cependant cette instabilité dans le fromage mériterait d'être vérifiée pour être certain de l'absence de tout risque.

PARTIE EXPERIMENTALE

--0000000--

G É N É R A L I T É S

Les spectres infra-rouge (I.R.) ont été enregistrés sur un spectrophotomètre PERKIN-ELMER 157 G. Les fréquences sont données en cm^{-1} .

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton R.M.N. ^1H ont été enregistrés sur les appareils suivants :

- VARIAN A 60 (60 MHz)
- JEOL JNM 60 (60 MHz) (U.E.R. de Pharmacie de Lille)
- BRUCKER WP 60 (60 MHz)
- PERKIN ELMER R 32 (90 MHz) (I.R.C.L. de Lille)
- VARIAN XL 200 (200 MHz) (Société VARIAN, Suisse)
- CAMECA 250 (250 MHz) (Société CAMECA)
- BRUCKER WP 360 (360 MHz) (Société RHONE-POULENC, Saint-Fons)

Les déplacements chimiques sont exprimés en δ ppm à partir du triméthylsilane (TMS) pris comme référence interne. Les couplages sont donnés en Hz. Les lettres s, d, t, m ont été utilisées pour désigner la nature des signaux, respectivement singulet, doublet, triplet et multiplet. Les spectres ont été enregistrés dans le chloroforme deutérié.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du carbone ^{13}C ont été enregistrés sur les appareils suivants : (solvant CDCl_3) :

- BRUCKER WP 60 (15,1 MHz) (I.C.S.N., C.N.R.S. de Gif/sur/Yvette)
- JEOL FT 60 (15,1 MHz) (Université de Poitiers)
- BRUCKER HX 90 (25,2 MHz) (I.C.S.N., C.N.R.S. de Gif/sur/Yvette)
- PERKIN ELMER R 32 (22,6 MHz) (I.R.C.L. de Lille)
- BRUCKER WP 360 (90 MHz) (Société RHONE-POULENC, Saint-Fons)

Les spectres de masse (S.M.) ont été enregistrés sur des appareils :

- A.E.I. MS 50 (I.C.S.N., C.N.R.S. de Gif/sur/Yvette)
- A.E.I. MS 12 (Université de Bordeaux 1)
- A.E.I. MS 9 (haute résolution)

et sur un appareil RIBER.

Les spectres ultra-violet (U.V.) ont été enregistrés sur un appareil CARY 118 C ou BECKMAN modèle 24.

Les pouvoirs rotatoires ($[\alpha]_D$) ont été mesurés à 589 nm sur un polarimètre PERKIN-ELMER 141.

Les dispersions rotatoires (DR) ont été enregistrés sur un spectropolarimètre FICA spectropol 1.

Les mesures de dichroïsme circulaire (DC) ont été prises sur un dichrographe JOBIN-YVON RJ MARK III.

Les points de fusion (F) ont été pris au banc KOFLER et ne sont pas corrigés.

Les chromatographies sur colonnes ont été faites sur gel de silice MERCK (0,06-0,2 mm). Les chromatographies sur couches minces (CCM) sont réalisées avec de la silice MERCK G. Les colonnes pour chromatographies liquide haute performance CLHP sont des colonnes WATERS garnies de silice (10 μ m) de 30 cm de longueur et de 0,4 cm de diamètre intérieur.

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est réalisée avec l'appareillage suivant : une pompe WATERS 6000 A, un injecteur universel U 6K, un détecteur UV M-440 à filtres interférentiels et un détecteur à indice de réfraction R 401.

Une "extraction de la manière habituelle" signifie : évaporation des solvants de la réaction quand ils sont miscibles à l'eau, extraction à l'éther éthylique du résidu ou du mélange réactionnel additionné d'eau, lavage de la phase organique avec une solution aqueuse acide ou basique, puis avec une solution saturée de NaCl jusqu'à neutralité, séchage sur sulfate de sodium et évaporation du solvant à sec.

PRODUCTION ET CARACTÉRISATION DES MÉTABOLITES

MICROBIOLOGIE

Nous disposons de diverses souches de *P. roqueforti* :

- la souche NRRL 849 a été obtenue auprès du Northern Regional Research Laboratory,
- la souche B utilisée pour l'affinage de fromages de type bleu d'Auvergne nous a été fournie par le Dr. M. JEMMALI, I.N.R.A. Service Mycotoxine (Paris),
- la souche B.15 (non productrice de métabolites toxiques) a été isolée d'un jus de fruit par Monsieur le Professeur PELHATE (Faculté des Sciences de Brest),
- la souche B.26 a été isolée d'un ensilage maïs par Monsieur le Professeur PELHATE ; elle a fait l'objet d'une détermination par le Centralbureau Voor Schimmelcultures à Baarn (Pays-Bas).

Avant toute utilisation, chaque souche est clonée au micromanipulateur ce qui permet de s'assurer de l'homogénéité génétique du matériel utilisé.

Les spores isolées sont ensemencées en tubes inclinées sur milieu "Potatoes Dextrose Agar" (P.D.A.) DIFCO. Une suspension de spores est réalisée à partir de ces tubes et on ensemence environ 10^6 à 10^8 spores par fioles de cultures. Le milieu de culture utilisé est le suivant pour un litre d'eau permittée : 150g de saccharose, 20g d'extrait de levure DIFCO, 1g KH_2PO_4 , 0,5g de MgSO_4 , 7 H_2O , 0,1g CaCl_2 , 2 H_2O , 0,01g de ZnSO_4 , 7 H_2O , 0,01g de FeCl_2 , 4 H_2O , 0,01g MnSO_4 , H_2O . Ce milieu est filtré sur membrane millipore 0,22 μm ou stérilisé à l'autoclave à 110° pendant 20' en fioles de Roux (150 ml de milieu par fiole).

Les fioles sont incubées en cultures stationnaires pendant 8 à 14 jours à 25°C à l'obscurité. Après cette culture, le milieu de culture est séparé de la masse mycélium par filtration.

EXTRACTION, PURIFICATION

Le milieu de culture filtré est extrait au chloroforme dans une ampoule à décanter ; l'extrait est concentré à l'évaporateur rotatif à 50°.

- Souche NRRL 849 : L'extraction du milieu de culture de 100 fioles (14 jours de culture) permet de récupérer un extrait brut huileux de 3,5g. Cet extrait est chromatographié sur une colonne de silice (200g). On élue successivement par 250 ml de mélange chloroforme-méthanol (0%, 1%, 2%, 5%, 10% en méthanol). On recueille des fractions de 50 ml. L'élution à 1% permet de récupérer PRT, EC est élué par le mélange à 3%, enfin ED est récupéré par élution avec le mélange à 5%. Les fractions sont analysées par CCM. Les plaques CCM sont éluées par un mélange chloroforme-méthanol, 95/5. La révélation se fait en plusieurs étapes :

- Irradiation U.V. 254 nm (environ 30s), puis 360 nm, PRT apparaît comme une tache fluorescente verte.
- Pulvérisation d'acide sulfurique pur, puis examen sous U.V. à 360 nm, PRT apparaît comme une tache fluorescente verte, EC apparaît alors comme une tache (plus polaire, fluorescente en bleu clair).
- La plaque est chauffée à 110°, 20 minutes, le composé ED (le plus polaire) apparaît comme une tache rouge-violet.

Les fractions contenant les mêmes composés sont regroupées. La fraction PRT est reprise dans un minimum d'éther éthylique et on obtient, après plusieurs cristallisations successives 200 mg de cristaux blancs. EC cristallise difficilement dans l'éther éthylique (20 mg de cristaux incolores). Enfin, la fraction ED est cristallisée à froid dans l'acétate d'éthyle (100 mg).

- Souche B : L'extraction d'une centaine de fioles permet d'obtenir 3g d'une huile brune. Cet extrait est soumis à la même chromatographie que précédemment. Le contrôle en CCM des diverses fractions polaires (de 1 à 5% en méthanol) permet de déceler 5 taches différentes. Dans l'ordre des polarités croissantes, on observe :

EA : fluorescent faiblement en bleu foncé à 360 nm, puis plus intensément en bleu plus clair après pulvérisation à l'acide sulfurique.

PRT: déjà caractérisé.

EB : fluorescent en bleu à 360 nm et ne fluorescent plus après pulvérisation à l'acide.

EC ,, puis ED.

Les fractions EA, PRT, EB sont éluées avec le mélange à 1% en méthanol. La séparation de ces trois composés (environ 500 mg) a été réalisée par une chromatographie sur gel de silice H (36g) pour une colonne de \varnothing 2cm L'élution avec du chloroforme méthanol 0,5% permet de séparer facilement EA, PRT, EB dans cet ordre en récupérant des fractions de 5 ml (quantité totale éluee 250 ml). La cristallisation à -20°C dans l'éther éthylique de la fraction correspondante permet de récupérer EA 70 mg. PRT traité comme précédemment donne 170 mg de cristaux. EB cristallise également dans l'éther éthylique (90 mg). On récupère également de l'extrait brut EC 30 mg et ED 70 mg.

- Isolement de PR imine et EE -

100 fioles d'une culture de 14 jours de la souche 849 ont été extraites de la manière habituelle. L'analyse CCM ne révèle pas la présence de PRT, mais la présence de composés plus polaires que ED.

Une chromatographie sur silice de l'extrait brut (2,7g) permet de séparer ED (élution à 5%) 100 mg. L'élution avec un mélange à 8% en CH₃OH permet d'éluer EE. EE apparaît en CCM comme une tache fluorescente jaune à 360 nm après pulvérisation à l'acide sulfurique. La cristallisation de cette fraction dans le méthanol permet d'isoler 90 mg de cristaux incolores. Le mélange à 10% élue une fraction qui précipité par addition d'éther éthylique. La cristallisation dans l'acétate d'éthyle permet d'isoler 140 mg de PR imine.

- Eremofortine A EA -

Cristaux blancs (éther éthylique)

F 159-161°C ; $[\alpha]_D + 205^\circ$ (C = 0,1, CHCl₃) ; SM, m/e 306(M⁺) ; 277, 246, 231, 218, 206, 177, 159, 149 ; SM haute résolution M⁺ 306, 14663 (calculé pour C₁₇H₂₂O₅ 306, 14671).

U.V. (CHCl₃) λ_{\max} 246 nm (ϵ 14700) ; I.R. (KBr) 1740, 1670, 1620 et 1240 cm⁻¹.

R.M.N. ^1H (250 MHz) ; δ ppm 1,01 (3H, d, $J = 7$ Hz, CH_3 -14) ; 1,32 (3H, s, CH_3 -12) ; 1,40(3H, s, CH_3 -13) ; 1,52(3H, s, CH_3 -15) ; 1,79(1h, qd, $J = 7$ Hz, $J_2 = 5$ Hz, H-4) ; 1,92(1H, d, $J = 15$ Hz, H-6_A) ; 2,14(1H, d, $J = 15$ Hz, H-6_B) ; 2,15(3H, s, CH_3 -COO) ; 3,77(1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-1) ; 3,9(1H, dd, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz, H-2) ; 5,12(1H, t, $J = 5$ Hz, H-3) ; 6,25(1H, s, H-9).

R.M.N. ^{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).

- Eremofortine B EB -

Cristaux incolores (éther éthylique)

F 121-123°C, $[\alpha]_D + 115^\circ$ (C = 0,1, CHCl_3) ; SM m/e 248 (M^+), 233, 190, 180, 151.

U.V. (CHCl_3) λ_{max} 249 nm (ϵ 15800). I.R. (KBr) 3520, 1670 et 1620 cm^{-1} .

R.M.N. ^1H (250 MHz) ; δ ppm, 1,09 (3H, d, $J = 7$ Hz, CH_3 -14) ; 1,36 (3H, s, CH_3 -15) ; 1,52 (1H, qd, $J_1 = 7$ Hz, $J_2 = 5$ Hz, H-4) ; 1,72 (3H, d, d, $J_1 + J_2 = 2,2$ Hz) ; 2(1H, échangeable avec D_2O O-H) ; 3,26 (1H, d, d, $J_1 = 14$ Hz, $J_2 = 5$ Hz, H-7) ; 3,69(1-H, d, $J = 3,5$ Hz, H-1) ; 3,85(1H, d, d, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz, H-2) ; 4,12(1H, m, H-3) ; 4,84(1H, m, H-12) ; 5(1H, m, H-12) ; 6,2(1H, s, H-9).

R.M.N. ^{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 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$: Cal. % C 72,55 ; H 8,12

Trouvé C 72,53 ; H 8,06

L'effet Overhauser a été mesuré sur appareil Varian XL 200. L'échantillon (5 mg) a été préparé dans le chloroforme en tubes scellés, le découplage a été réalisé en temps partagé en irradiant pour 30 secondes les pics envisagés.

- Eremofortine C EC -

Cristaux blancs (éther éthylique)

F 122-126°C ; SM, m/e 322 (M^+), 191, 177, 163, 149

I.R. (KBr) 3420, 3350, 1685, 1650 et 1620 cm^{-1} .

R.M.N. ^1H (250 MHz) δ ppm 2,18 et 2,19 ($\text{CH}_3\text{-COO}$), 5,18 et 5,25 (m, H-3), 6,02 et 6,44 (H-9)

Analyse $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6$: Calc. % C 63,34 ; H 6,89
Trouvé C 63,26 ; H 6,92

- Acétate de EC -

L'acétylation de EC (140 mg) dans 15 ml d'une solution AC_2O -pyridine à la température ordinaire en une nuit donne 120 mg d'un composé cristallisé EC acétate.

F 122-124°C ; $[\alpha]_D + 161^\circ$ (C = 1,1, CHCl_3)

S.M. m/e 364 (M^+), 322, 291, 279, 205, 191, 177.

U.V. (CHCl_3) λ_{max} 248 nm ($\epsilon = 16960$) ; I.R. (KBr) 1745, 1740 et 1685 cm^{-1}

R.M.N. ^1H (60 MHz) δ ppm 1,07 (3H, d, J = 6,5 Hz, $\text{CH}_3\text{-14}$); 1,4 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-13}$) ; 1,47 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-15}$) ; 2,1 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-COO}$) ; 2,15 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-COO}$); 3,72 (1H, d, J = 3 Hz) ; 4 (1H, m, H-2) ; 4,6 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-12}$) ; 5,25 (1H, m, H-3) ; 6,55 (1H, s, H-9).

R.M.N. ^{13}C (15,1 MHz) δ ppm (Référence TMS) C-1, 55,8 (d) ; C-2, 55,2 (d) ; C-3, 70,0 (d) ; C-4, 41,8 (d) ; C-5, 37,3 (s) ; C-6, 42,3 (t) ; C-7, 61,9 ou 64,2 (s) ; C-8, 192,9 (s) ; C-9, 131,5 (d) ; C-10, 161,4 (s) ; C-11, 61,9 ou 64,2 (s) ; C-12, 65,3 (t) ; C-13, 22,6 (q) ; C-14, 10,4 (q) ; C-15, 16,4 (q) ; C-16 et C-18, 170,2 (s) ; C-17 et C-19, 20,8 (q).

Analyse $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_7$: Calc. % C 62,62 ; H 6,64
Trouvé C 62,49 ; H, 6,63

- Réduction de PRT -

PRT (240 mg) est réduit par 17 mg de NaBH_4 dans 40 ml de CH_3OH à -5°C . pendant 20 minutes. L'extrait brut est purifié sur colonne de silice. On obtient après cristallisation PRT non réduite 120 mg, et EC (100 mg). Toutes les données spectroscopiques de EC sont identiques à celles de EC (composé naturel) en particulier les spectres de masse, I.R., R.M.N. ^1H . Le point de fusion de mélange avec EC est identique 122-126°C.

- Eremofortine D ED -

Cristaux blancs (Acétate d'éthyle)

F 209-211°C ; $[\alpha]_D + 91^\circ$ (C = 0,12, CHCl₃) ; SM m/e 324 (M⁺), 293, 207, 161, 137, 109

I.R. (KBr) 3420, 1735, 1250 cm⁻¹

R.M.N. ¹H (250 MHz) δ ppm 0,92 (3H, d, J = 7 Hz, CH₃-14) ; 1,18(3H, s, CH₃-15) ; 1,39(1H, d, J = 13 Hz, H-6_A) ; 1,45(1H, s, CH₃-13) ; 1,65(1H, qd, J₁ = 7 Hz, J₂ = 6 Hz, H-4) ; 1,80(1H, J = 13 Hz, H-6_B) ; 2,12(3H, s, CH₃ COO) ; 2,62(1H, échangeable avec D₂O, O-H) ; 3,16(1H, d, J = 4 Hz, H-1) ; 3,46(1H, dd, J₁ = 5 Hz, J₂ = 4 Hz) ; 3,83(2H, s, CH₂-12) ; 5,24(1H, dd, J₁ = 6 Hz, J₂ = 5 Hz).

R.M.N. ¹³C, 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 C₁₇H₂₄O₆ : Calc. % C 62,95 ; H 7,46

Trouvé C 62,73 ; H 7,44

- Eremofortine E EE -

Cristaux incolores (méthanol)

F 240°C (dec) ; $[\alpha]_D + 227^\circ$ (C = 0,54, CHCl₃) ; SM m/e 318 (M⁺ -17), 291, 276, 220, 178, 135, 91 ; Masse haute résolution M⁺ -17, 318, 1109 cal. pour C₁₇H₁₈O₆ 318, 1103.

U.V. CHCl₃ λ_{max} 250 nm (ε 15720).

I.R. (KBr) 3480, 3160, 1735, 1710, 1680, 1665, 1620 cm⁻¹.

R.M.N. ¹H (60 MHz) δ ppm 1(3H, d, J = 7,5 Hz, CH₃-14) ; 1,32(3H, s, CH₃-15), 1,60(3H, s, CH₃-13) ; 2,16(3H, s, CH₃-COO) ; 3,6(1H, d, J = 3,5 Hz, H-1) 3,9(1H, m, H-2) ; 5,12(1H, t, J = 5 Hz, H-3) ; 5,6(1H, s large, échangeable avec D₂O, N-H) ; 6,1(1H, s large, échangeable avec D₂O, N-H) ; 6,35(1H, s, H-9).

R.M.N. ¹³C (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, 64,7 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°C - F mélange identique avec échantillon de synthèse

$[\alpha]_D + 315^\circ$ (C = 0,48 CHCl₃) ; SM m/e 319 (M⁺), 290, 276, 216, 188, 160.

I.R. (KBr) 3150, 1735, 1625 cm⁻¹

U.V., CHCl₃, λ_{\max} 248 mm ($\epsilon = 12740$).

R.M.N. ¹H (60 MHz) ; δ ppm 1 (3H, d, J = 7 Hz, CH₃-14) ; 1,35(3H, s, CH₃-15) ; 1,62(3H, s, CH₃-13) ; 2,16(3H, s, CH₃COO) ; 3,7(1H, d, 3,5 Hz, H-1) ; 3,8(1H, m, H-2) ; 5,2(1H, t, J = 5 Hz, H-3) ; 5,4(1H, s, H-12) ; 5,4(1H large échangeable D₂O) ; 6,7(1H, s, H-9).

R.M.N. ¹³C (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, 67,8 ou 72,1 (s) ; C-12, 93,8 (d) ; C-13, 10,3 (q) ; C-14, 10,3 (q) ; C-15, 21,6 (q) ; C-16, 170,6 (s) ; C-17, 20,7 (q).

Analyse C₁₇H₂₁O₅N : 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

- Souche B-26 :

L'extraction chloroformique du milieu de culture de 50 fioles permet de récupérer un extrait brut huileux (2,2g). Cet extrait est chromatographié sur une colonne de silice (200g). La colonne est éluée par un gradient de CH_3OH dans CHCl_3 . Un mélange à 2% en CH_3OH élue 850 mg d'un composé qui est révélé en C.C.M. par pulvérisation à l'acide sulfurique pur et chauffage à 110° pendant 10 minutes (tache rouge-violet).

Cette fraction est soumise à une C.L.H.P. préparative colonne 30 cm x 2 cm ; silice 5-20 μm ; solvant hexane/acétate d'éthyle (30/70, U/V) ; débit 9,9 ml/minutes. Détection par réfractomètre différentiel. La fraction correspondant à la tache rouge-violet est éluée au bout de 20 minutes (60 mg). La cristallisation dans l'éther éthylique (-20°) donne des cristaux blancs (10 mg 16).

- Botryodiplodin 16 : Cristaux blancs

F 50° - 52°C , $[\alpha]_D - 85,5^\circ$, $t = 0$ et $-70,5^\circ$, $t = 45$ minutes
($C = 0,1$, CHCl_3) ; S.M., m/e 126 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 98, 87, 85, 83, 71
S.M. haute résolution $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ 126, 0688.

(calculé pour $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2$ 126, 06807)

U.V. (CHCl_3) λ_{max} 278 nm ($\epsilon = 25$) ; I.R. 3600, 3400, 1720 cm^{-1}

R.M.N. ^1H (90 MHz) δ ppm 0,80 ; 0,90 ; 1 ; 1,05 (3H) ; 2,2 ; 2,7 (3H) ; 2,6 (1H, m) ; entre 3,3 et 4,4 (4H m complexe) ; 5,2 ($\sim 1\text{H}$, s).

- 17 : L'acétylation pyridinique de 16 (100 mg non cristallisé) pendant une nuit permet de récupérer 17 (85 mg) qui cristallise dans l'éther éthylique à froid (60 mg).

Cristaux blancs.

F 45 - 47°C ; $[\alpha]_D - 104^\circ$ ($C = 0,09$, CHCl_3), S.M. m/e 126 ($\text{M}^+ - \text{ACOH}$), 98, 87, 85, 83, 71 ; S.M.I.C. m/e 127 ($\text{M}^+ + 1 - \text{ACOH}$) 98, 87, 85, 83, 71.

I.R. 1735, 1720 cm^{-1}

U.V. λ_{max} 277 nm ($\epsilon = 29$)

R.M.N. ^1H (60 MHz) δ ppm, 0,92 (3H, d, $J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_3 - 5$) = 2,06 (3H, s, $\text{CH}_3 - 9$) 2,23 (3H, s, $\text{CH}_3 - 7$) 2,7 (1H, q, $J = 7,5$ Hz, H-2), 3,8 (1H, m, H-3) ; 4,22 (2H, m, H-4) ; 5,95 (1H, s, H-1).

R.M.N. ^{13}C (15, 1 MHz), δ ppm C-1, 104,2 (d) ; C-2, 41,7 ou 52,8 (d) ; C-3, 52,8 ou 41,7 (d) ; C-4, 6,77 (t) ; C-5, 12,2 (q) ; C-6, 205,4 (s) ; C-7, 30,3 (q) ; C-8, 170,3 (s) ; C-9, 21,3 (q).

TABLEAU 1 : Valeurs des déplacements chimiques en R.M.N. ^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 2,14			6,25			1,32	1,40	1,01	1,52		2,
PRT	***	3,65	3,96	5,16	1,79		1,81 2,16			6,43			9,75	1,49	1,03	1,45		2,
EB	*	3,69	3,85	4,12	1,52			3,26		6,20			4,84 5,0	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,
EE	****	3,6	3,9	5,12						6,35			5,6 6,1	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 25

**** : 60 MHz



TABLEAU 2 : Valeurs des déplacements chimiques en R.M.N. ^{13}C (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	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	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	42,3	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 ou 43,9	38,4	35,6 ou 34,3	61,1 ou 68,4	101,9	34,3 ou 35,6	43,9 ou 41,7	68,4 ou 61,1	69,7	11,3	9,7	15,5	171	20,8	
EE	55,9	55,2	69,9	42,5	37,5	40,9	65,2 ou 64,7	190,6	130,6	162,9	64,7 ou 63,2	172,6	16,6	10,2	22,2	170,7	20,7	
PR imine	56,8	54,9	70,4	42,7	38,5	36,2	67,8 ou 72,1	157,8	124,7	157,8	78,1 ou 57,8	93,8	10,3	10,3	21,6	170,7	20,7	



B I O S Y N T H E S E

METHODE DE DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE : C.L.H.P.

On réalise des solutions standards à partir des composés cristallisés EA, PRT, EB, EC. Une solution standard du mélange EA, PRT, EB est réalisée dans du chloroforme (MERCK pour analyse). Cette solution concentrée contient 0,5 mg de chacun des composés par ml de solution. On réalise par dilution des solutions à 0,05 mg/ml, 0,005 mg/ml et 0,0005 mg/ml. Une solution concentrée standard de EC est réalisée de la même manière. Par dilution on obtient des solutions à 0,05 mg/ml et 0,005 mg/ml.

Les éluants utilisés sont les suivants :

- A. n-hexane (MERCK pour analyse), THF (solvant, documentation, synthèse, pour chromatographie liquide) 75/25, Vol/Vol.
- B. Chloroforme pour analyse MERCK

Les conditions de chromatographie sont les suivantes :

- solvant A : débit 1,5 ml/mn détecteur filtre à 254 nm,
sensibilités utilisées de 0,5 à 0,005 Unités d'Absorbance sur l'échelle de l'enregistreur (20 cm)
- solvant B : débit 2 m/mn

On injecte 10 μ l de solutions standards. On mesure les hauteurs de pics. Ces hauteurs sont corrigées par l'expression $H = \text{hauteur de pic (mm)} \times \text{sensibilité du détecteur}$.

ETUDE CINETIQUE

- Souche B : On ensemence 36 fioles de Roux contenant le milieu habituel. Les cultures sont réalisées comme pour l'isolement des métabolites. On prélève aux jours déterminés (J. 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 21, 25) trois fioles de cultures. On sépare milieu et mycélium. Les milieux sont rassemblés et extraits au chloroforme. L'extrait est concentré à l'évaporateur rotatif. Des dilutions adaptées de cet extrait (dans CHCl_3 pour analyse) sont injectées en CLHP pour dosage. Chaque mycélium est déshydraté dans une étuve à 110°C jusqu'à obtention d'un poids sec constant. On fait une moyenne de trois poids secs obtenus pour un jour déterminé.

- Souche NRRL 849 : On ensemence 30 fioles de Roux contenant le milieu habituel. Les prélèvements sont réalisés au 4, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 15, 20, 25 jours. Les fioles sont traitées comme précédemment.

ETUDE AU CARBONE ^{13}C

- Incorporation de l'acétate de sodium $^{13}\text{C-1} \text{CH}_3\text{-}^{13}\text{COONa}$:

On utilise 5 fioles de culture de la souche NRRL 849. L'acétate de sodium $^{13}\text{C-1}$ (500 mg CEA enrichi à 90%) est additionné stérilement en solution aqueuse au 3ème et 6ème jours de culture. La culture est extraite au 14ème jour. On récupère après purification 40 mg de PRT cristallisée. On enregistre dans les mêmes conditions le spectre R.M.N. ^{13}C de ce lot de PRT et celui d'une PRT non incorporée.

- Incorporation de l'acétate de sodium $^{13}\text{C-1-2}, ^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{COONa}$:

On utilise 10 fioles de culture de la souche NRRL 849. L'acétate de sodium ^{13}C (1g, CEA) est repris dans 50 ml d'eau distillée et stérilisé sur membrane millipore $0,22 \mu\text{m}$. On injecte dans chaque fiole 1 ml de cette solution stérile aux jours suivants : 7, 8, 9, 11 et 13ème. On extrait le milieu de culture au 14ème jour. On obtient après cristallisation 65 mg de cristaux PRT.

La première analyse en R.M.N. ^{13}C est réalisée à 15 MHz. La deuxième analyse à 90 MHz.

FRACTIONNEMENT ENZYMATIQUE

- Préparation du cytosol de *P. roqueforti* :

On prélève 1 mycélium d'une fiole de culture (souche NRRL 849). Ce mycélium est soigneusement lavé à l'eau distillée, puis il est mis en suspension dans une solution de KCl (150 mM) à raison de 0,5 ml par gramme. Ce mycélium est broyé une première fois au broyeur VIRTIS (3 x 30s) puis à l'ultra turax (3 x 30s), tout en maintenant la température avec un bain de glace. Enfin le mycélium est broyé au broyeur à billes. L'éclatement des cellules est contrôlé au microscope. La suspension obtenue est centrifugée une première fois à 12000 tr/mn pendant 20 minutes, le culot est éliminé, le surnageant est soumis à une nouvelle centrifugation à 45.000 tr.mn pendant 90 minutes. Le culot constitue les microsomes, le surnageant le cytosol. Ce surnageant est concentré au 1/10 du volume initial par ultra filtration sur membrane. Le dosage des protéines selon LOWRY est effectué sur ce concentré. On obtient une teneur moyenne de 2 à 3 mg de protéines par ml.

- Incubation :

1° - In vitro : L'incubation type réalisée est la suivante : on utilise 0,1 mg de protéines dans 0,3 ml de tampon phosphate pH 7. A ce mélange on ajoute 0,6 μ M de substrat dans 2 μ l de méthanol. On incube 1 heure à 20°, on extrait ensuite au chloroforme l'incubat d'extrait qui est ensuite analysé en CCM.

2° - In vivo :

- Métabolisation de la pulégone : à une fiole de culture de la souche NRRL 849, âgée de 7 jours, on ajoute 200 μ l de pulégone dans 1 ml d'acétone (dans le milieu de culture). Au 14ème jour, on extrait au chloroforme le milieu de culture. L'extrait est chromatographié sur silice par élution de mélanges Ether de pétrole, acétate d'éthyle. Les fractions purifiées sont contrôlées par R.M.N. 'H. Le produit majoritaire est la pulégone. On détecte également un produit de réduction de la cétone.

- Synthèse des époxydes de la pulégone : à 1,5g de pulégone en solution dans 100 ml de CH_2Cl_2 , on ajoute 2g d'acide méchloroperbenzoïque en solution dans 100 ml de CH_2Cl_2 gouttes à gouttes à 5°. On laisse ensuite remonter la température à 20° pour une heure. Après extraction on purifie par chromatographie sur silice en éluant par des mélanges éther éthylique, éther de pétrole. Par cristallisation dans l'hexane on obtient des cristaux blancs (1,3g) de PF de 38 à 42°C.

L'analyse en R.M.N. ¹H montre que l'on a affaire au mélange de diastéréoisomères (80).

- Incubation : On injecte 1g d'époxydes dans 5 fioles à raison de 0,2g par fiole (dans 200 μ l d'acétone) de culture de NRRL 849 (J₇). Au 14^{ème} jour on extrait le milieu de culture au chloroforme. Une chromatographie du brut (700 mg) permet de récupérer l'époxyde de départ (330 mg) et 50 mg d'un produit plus polaire, dont la R.M.N. et l'I.R. indique qu'il s'agit d'un produit de réduction de la cétone de départ.

M É T A B O L I S A T I O N D E S

M É T A B O L I T E S D E *P. roqueforti*

I - PREPARATION DES FRACTIONS CELLULAIRES DE L'HEPATOCYTE DE RAT -

Des rats mâles (Wistar) pesant environ 250g reçoivent pendant trois jours consécutifs une injection intrapéritonéale de méthyl-3 cholanthrène (20 mg/Kg dissous dans l'huile de maïs). Ils sont triés, les foies sont prélevés et homogénéisés dans trois volumes d'un tampon de KCl (150 mM). L'homogénat est centrifugé à 15.000g pendant 20 minutes. Le culot est éliminé et le surnageant post-mitochondrial est soumis à une nouvelle centrifugation à 200.000g (Rotor Ti Beckman). Le surnageant à 200.000g constitue le cytosol. Le culot microsomal est lavé deux fois avec le tampon suivant : 10 mM tris HCl, pH 7,4 contenant 0,5 mM MgCl₂, 0,25 M saccharose. Les microsomes sont mis en suspension dans ce tampon et conservés dans l'azote liquide. Le cytosol est conservé de la même manière. Le dosage des protéines sur les microsomes et le cytosol est réalisé par la méthode de LOWRY (le standard est l'albumine sérique bovine).

II - INCUBATIONS -

a) ANALYTIQUE :

L'incubation est réalisée dans des petits erlenmeyer (20 ml) non bouchés à 37°C, avec une agitation lente pendant 1 à 2 heures. Le milieu de réaction (6,5 ml de tampon, 10 mM tris-HCl pH 7,4 ; 0,5 mM MgCl₂ ; 0,25 M saccharose) contient 5 mg de protéines (microsomales ou cytosoliques) et dans certaines expériences 5 µM de NADPH. PRT, PRT¹⁴C, ou EA, sont ajoutés (1,5 µM dans 20 µl de méthanol) audébut de l'incubation. La réaction est arrêtée par addition de chloroforme (30 ml). Les métabolites sont extraits par 3 x 30 ml de chloroforme, l'extrait est analysé par C.C.M. (voir partie expérimentale relative à la caractérisation des métabolites). Lorsque PRT¹⁴C est le substrat de réaction, on utilise pour la C.C.M. de la silice déposée sur feuilles d'aluminium. Après migration la feuille est découpée en bande de 0,5 cm. Chaque bande est comptée par un appa-

reil à scintillations avec un liquide scintillant à base de toluène.

b) PREPARATIVE :

Les quantités de tampon, protéines, NADPH sont adaptées à la quantité de substrat utilisée.

Pour 20 mg de métabolite (PRT ou EA) on utilise : 150 ml de tampon, 200 mg de protéines, 200 μ M de NADPH. Les incubations sont réalisées dans 4 fioles différentes agitées à 37°C à l'air libre pendant 1 à 2 heures. Elles sont arrêtées par addition de chloroforme. Les extraits chloroformiques des 4 fioles sont regroupés et chromatographiés sur silice. Une colonne de 10g de silice éluée par 20 ml de mélanges $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ de 0,5 ; 1, 2, 5, 10, 20% en CH_3OH permet de séparer tous les métabolites obtenus. Les métabolites obtenus sont cristallisés dans les solvants adéquats.

III - PREPARATION DE PRT ^{14}C -

a) A une fiole de culture de la souche NRRL 849, on ajoute stérilement au 11ème jour 0,1 mCi d'acide mévalonique ^{14}C -2 (Activité Spécifique 36,5 mCi/mMole). Le milieu de culture est extrait le 14ème jour. L'extrait chloroformique est chromatographié sur une colonne de silice 500 mg. La fraction contenant PRT est dosée par CLHP et comptée au compteur à scintillations. On obtient 0,1 μ Ci de PRT ^{14}C (Activité spécifique 0,27 mCi/mMole). La pureté chimique est testée par CLHP et la pureté radiologique par un profil en C.C.M. sur feuille d'aluminium.

b) 15 mg de 3-hydroxy PRT (dans 80 μ l de pyridine) sont acétylés avec 1 mCi de AC_2O , ^{14}C -(0) (CEA, 56,6 mCi/mM). Après 48 heures on extrait de la manière habituelle. Le brut d'extraction est purifié par CLHP sur une colonne de SiO_2 (10 μ m) avec élution par un mélange THF/Hexane 25/100. On obtient 8 μ Ci de PRT ^{14}C . Le dosage effectué par CLHP permet de déterminer l'activité spécifique : 1,02 mCi/mM.

c) 16 mg de 3-hydroxy PRT sont acétylés par 5 mCi AC_2O ^{14}C -(0) (57 mCi/mM). Après extraction, purification et dosage comme précédemment on obtient 100 μ Ci de PRT ^{14}C à 21 mCi/mM.

IV - STRUCTURES DES METABOLITES -

PRT 3 hydroxy 7 : ce métabolite est obtenu par incubation de PRT en présence de microsomes. A partir de 20 mg de PRT on obtient 9 mg de PRT 3 hydroxy. On obtient également ce métabolite par saponification de PRT (25). Toutes les données spectroscopiques sont en accord avec celles rapportées dans la littérature. Le point de fusion de mélange ne montre aucun abaissement. F 152-154°C. M.S. m/e 278, 277, 235 (spectre de masse des composés de synthèse et de métabolisation identiques).

EC 3 hydroxy 9 : 9 est obtenu par incubation de PRT avec des microsomes hépatiques en présence de NADPH ou par incubation de EC par des microsomes en l'absence de NADPH ou par incubation de 10 en présence de NADPH ou de 7 par des microsomes plus le cytosol en présence de NADPH. Toutes ces métabolisations conduisent à isoler 9 dont les comportements en C.C.M. et les spectres de masse sont identiques et sont identiques à un composé 9 obtenu chimiquement par :

- saponification de EC (rendement faible)
- réduction de 7 par NaBH_4

122 mg de 7 sont réduits par 8 mg de NaBH_4 dans 40 ml de CH_3OH à 0° (temps de réaction : 1/2 heure) après chromatographie sur silice éluée par un gradient $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ on récupère 48 mg de 9 (cristallisation dans l'acétate d'éthyle).

F 170°C (dec)

I.R. (KBr) 3460, 3390, 1685 cm^{-1}

S.M. m/e 280 (M^+), 237, 191, 177, 149, 121, 91

la mesure en haute résolution de $\text{M}^+ = 280, 13 149$.

(calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_5$ 280, 13 106)

Analyse : Calculé C % 64,27 ; H % 7,19

Trouvé C % 64,17 ; H % 7,36

R.M.N. ^1H (CD_3OD) (voir texte)

EA 3 hydroxy 10 : 10 est obtenu essentiellement par métabolisation de EA par des microsomes en l'absence de NADPH. Ce composé est identique au produit de saponification de EA. La saponification de EA (50 mg) par la protéine méthanolique (0,02 M KOH dans un mélange $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 4/1) 10 ml à 37°C pendant 2 heures permet d'isoler après extraction un composé cristallisé à partir du mélange éther éthylique-éther isopropylique (25 mg).

F 128-130°C $[\alpha]_D^{20} + 143^\circ$ (C, 1,04, CHCl_3)

U.V. (CHCl_3) λ_{max} 246 nm ($\epsilon = 13200$) ; I.R. (KBr) 3570, 3510, 3380 et 1635 cm^{-1} .

S.M. m/e 264 (M^+), 235, 177, 149 ; S.M. haute résolution $\text{M}^+ = 264$, 13598 (calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_4$ 264, 13615).

R.M.N. ^1H (60 MHz) δ ppm 1,09 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, CH_3 -14 ; 1,28 (3H, s, CH_3 -12) ; 1,40 (3H, s, CH_3 -13) ; 1,52 (3H, s, CH_3 -15), 3,7 (1H, m, H-1) ; 3,95 (1H, m, H-2) ; 4,12 (1H, m, H-3) ; 6,4 (1H, s, H-9).

SYNTHÈSES CHIMIQUES

α -diethyl-phosphopropionate d'éthyle 14 :

Dans un ballon de 500 ml équipé d'une ampoule à brome d'une courte colonne à distiller, d'une tête de distillation et d'un réfrigérant, on verse 166g (1 mole) de phosphite d'éthyle. On chauffe à 140° puis on ajoute, goutte à goutte, 181g (1 mole) de α bromopropionate d'éthyle. Le bromure d'éthyle distille et on monte la température à 160° puis 190° après addition totale de l' α -bromopropionate d'éthyle. On maintient pendant 1 heure cette température. Le brut est purifié par distillation sous vide, on obtient 150g d'un liquide incolore (115° à 0,6 mm).

R.M.N. ^1H : 1 massif complexe entre 1,1 et 1,6 ppm d'intensité 12H (4- CH_3) ; $\delta = 2,85$ ppm 1H (quadruplet double, $J_1 = 7$ Hz, $J_2 = 23$ Hz (couplage P, H)).

α -cyclohexylidène-propionate d'éthyle 13 :

A 500 ml d'éthanol absolu distillé sur magnésium on ajoute 11,5g de sodium (0,5 mole). A cette solution maintenue à 20° on ajoute, goutte à goutte, 14 (110g). Après une heure on ajoute la cyclohexanone (49g) et on maintient la température à 20°. Après une nuit de réaction on purifie par distillation, on obtient 22g d'ester 13 (85°, 0,6 mm).

I.R. 1715 cm^{-1} ; S.M. m/e 182, 1301 (M^+) calculé pour $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2$ 182, 1306.

R.M.N. ^1H δ ppm 1,25 (3H, t, $J = 7$ Hz) ; 1,8 (3H, s) ; 4,1 (2H, q, $J = 7$ Hz).

R.M.N. ^{13}C δ ppm C-1, 171,5 ; C-2, 121 ; C-3, 16,2 (q) ; C-4, 148 ; C-5, 32,3 ou 33,5 ; C-6, 29,3 ou 28,8 ; C-7, 27,6 ; C-8, 28,8 ou 29,3 ; C-9, 33,5 ou 33,2 ; C-10n 61,2 (t) ; C-11, 15,4 (q).

Cyclohexylidène-2 propanol 1 11b :

A une suspension de LiAlH_4 (400 mg) dans l'éther anhydre (40 ml) on ajoute, goutte à goutte, l'ester 13 (1,7g) dans l'éther anhydre (20 ml). On porte à reflux une heure. Après extraction de la manière habituelle, on distille sous vide, on obtient 11b (1,5g) (80° à 0,2 mm).

S.M. m/e 140, 1202 (M^+) calculé pour $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}$ 140, 1201

I.R. 3600 et 3450 cm^{-1}

R.M.N. ^1H δ ppm 1,8 (3H, s) ; 3 (1H, échangeable avec D_2O) ; 4,2 (2H,s).

R.M.N. ^{13}C δ ppm C-1, 64,3 (t) ; C-2, 138,7 ; C-3, 17,3 (q) ; C-4, 124,5 ; C-5, 31,9 ou 31,3 ; C-6, 29 ou 29,6 ; C-7, 28 ; C-8, 29,6 ou 29 ; C-9, 31,3 ou 31,9.

époxyde 12b :

On dissout 11b (1,7g) dans 20 ml de CH_2Cl_2 , on ajoute lentement l'acide m chloropubenzoïque (2,60g) dans CH_2Cl_2 (50 ml). On porte à reflux 0,5 heure et on extrait de la manière habituelle. L'extrait (1,5g) est purifié par chromatographie sur silice par élution de mélanges éther éthylique, éther de pétrole, on obtient 1,2g de l'époxyde 12b.

S.M. m/e 156,1157 (M^+) calculé pour $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_2$ 156, 1150

I.R. 3610, 3440 cm^{-1}

R.M.N. ^1H δ ppm 1,5 (3H, s) ; 3,6 (1H, s, échangeable avec D_2O) ; 3,7 (2H, s)

R.M.N. ^{13}C C-1, 66 (t) ; C-2, 68,5 ou 66,5 ; C-3, 17 (q) ; C-4, 66,5 ou 68,5 ; C-5, 31,8 ou 32,6 ; C-6, 26,3 ou 26,9 ; C-7, 26,3 ; C-8, 26,9 ou 26,3 ; C-9, 32,6 ou 31,8.

α -cyclohexylidène propanone 1 11a :

1g de 11b est agité avec une suspension de 10g de MnO_2 dans 20 ml d'hexane pendant 24 heures à 20°C . Le mélange est ensuite filtré sur une courte colonne de silice pour éliminer le précipité. L'élution à l'éther permet de récupérer 700 mg d'une huile légèrement jaune. Cette huile est purifiée par chromatographie liquide haute performance préparative (colonne SiO_2 (5-20 μm) 60 cm longueur x 0,7 cm \varnothing . Solvant THF/hexane à 3 ml/mn). On obtient 300 mg liquide incolore.

I.R. 1680 cm^{-1} (CO conjugué)

R.M.N. ^1H δ ppm 1,75 (3H, s), 10(1H, non échangeable avec D_2O)

12b (1g) est oxydé dans les mêmes conditions et purifié de la même manière, on obtient 250 mg de 12a.

I.R. 1720 cm^{-1} (CO)

R.M.N. ^1H δ ppm 1,41 (3H, s) ; 9,4 (1H, non échangeable avec D_2O).

BIBLIOGRAPHIE

--0000000--

- (1) K. KANOTA
Studies on toxic metabolites of Penicillium roqueforti. Proc. 1st US Japan Conf. Toxic. Microorganism US Dept. Intern. un-numbered publications 1970, Washington DC 129-132.
- (2) R.D. WEI, P.E. STILL, E.B. SMALLEY, H.K. SCHNOES et F.M. STRONG
Isolation and partial characterization of a mycotoxin from Penicillium roqueforti
App. Microb. 25, 111, 1973.
- (3) W.P. BLOUNT
Turkey "X" disease and the labelling of poultry foods
Veterinary Records 73, 227, 1961.
- (4) K. SARGEANT, A. SHERIDAN, J. O'KELLY et R.B.A. CARNAGHAN
Toxicity associated with certain samples of groundnuts
Nature 192, 1096, 1961.
- (5) T. ASAO, G. BUCHI, M.M. ABDEL KADER, S.B. CHANG, E.L. WICK
et G.N. WOGAN
Aflatoxin B and G.
J. Amer. Chem. Soc., 85, 1706, 1963.
- (6) Moississures toxiques dans l'alimentation
C. MOREAU, Masson, Paris, 1974.
- (7) L.C. OLSON, C. BOURGEOIS, R. KESCHAMRAS, S. HARIKUL,
C. SANYAKORN, R. GROSSMAN et T. SMITH
Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera in thai
children
Amer. J. Dis. Child. 120, 1, 1970.
- (8) a) E. LE BRETON, C. FRAYSSINET et J. BOY
Sur l'apparition d'hépatomes spontanés chez le rat Wistar.
Rôle de la toxine d'A. flavus. Intérêt en pathologie humaine
et cancérologie expérimentale
C.R. Acad. Sci. Paris 255, 784, 1962.

- b) A.G. OETTLE
The actiology of primary carcinoma of the liver in africa.
A critical apparisal of previous ideas with an outline of
the mycotoxin hypothesis
S. Afr. Med. 39, 817, 1965.
- (9) F.G. PEERS et C.A. LINSELL
Dietary aflatoxine and liver cancer. A population based study
in Kenya
Br. J. Cancer. 27, 473, 1973.
- (10) C. FRAYSSINET, C. LAFARGE, A.M. DE RECONDO et C. LE BRETON
C.R. Acad. Sci. 259, 2143, 1964.
- (11) a) R.C. GARNER
Microsome-dependant binding of aflatoxine B₁ to DNA, RNA,
polyribonucleotides and protein *in vitro*
Chem. Biol. Interactions 6, 125, 1973.
- b) D.H. SWENSON, E.C. MILLER et J.A. MILLER
Aflatoxin B₁ -2,3 oxide evidence for its formation in rat
liver *in vivo* and by luiman liver microsomes *in vitro*
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1036, 1974.
- (12) a) Y. MOULE et C. FRAYSSINET
Enzymatic conversion of aflatoxine B₁ to a derivative in-
hibiting *in vitro* transcription
FEBS Letters 25, 52, 1972.
- b) R.C. GARNER, E.C. MILLER et J.A. MILLER
Liver microsomal metabolism of Aflatoxin B₁ to a reactive
derivative toxic to *Salmonella typhimurium*
Cancer. Res. 32, 2058, 1972.
- (13) C.N. MARTIN et R.C. GARNER
Aflatoxin B₁-oxide generated by chemical or enzymic oxidation
of aflatoxin B₁ causes guanine substitution in nucleic acids
Nature 267, 863, 1977.
- (14) E. CHAIN, H.W. FLOREY et M.A. JENNINGS
An antibacterial substance produced by *Penicillium claviforme*
Brit. J. Exp. Pathol. 29, 202, 1942.

- (15) R.B. WOODWARD et G. SINGH
The structure of patulin
J. Amer. Chem. Soc. 71, 758, 1949.
- (16) C. MOREAU et M. MOREAU
Un danger pour le bétail nourri de plantules fourragères
cultivées en germoirs : la pullulation d'une moisissure
toxique l'*Aspergillus clavatus* cause des accidents mortels
C.R. Acad. Agr. 46, 441, 1960.
- (17) P.M. SCOTT
Patulin in "Mycotoxines" 1974, 383-403, Elsevier Publishing
Company Amsterdam.
- (18) F. DICKENS et H.E.H. JONES
Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and
related substances
Brit. J. Cancer. 15, 85, 1961.
- (19) a) C.F. MAYER
Endemic panmyelotoxicosis in the Russian grain belt.
Part. 1 military Surgeon 113, 173, 1953
Part. 2 military Surgeon 113, 259, 1953.
b) A.Z. JOFFE
Alimentary toxic aluikia in "Microbial toxine", vol. VII
Kadis S. Ciegler A et Ajls
Acad. Press. 1971.
- (20) L.E. OLISON
Chemical action of some fungi on overwintered cereals
Mon. Orenburg Seet. USSR
D.J. Mendelejev Chem. Soc. 7, 37, 1957.
- (21) Y. UENO, M. SAITO, K. ISHII, K. SAKAI et N. ENOMOTO
Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria* sp.
Jap. J. Exp. Med. 42, 461, 1972.

- (22) Y. UENO
Mode of action of trichothecenes
Ann. Nutr. Alim. 31, 885, 1977.
- (23) K.B. RAPER, C. THOM et D.I. FENNEL
A manual of the Penicillia 1949, the Williams and Wilkins Company, p. 394.
- (24) J. PELHATE
Mycoflore des maïs-fourrages ensilés
Revue de mycologie 29, 65, 1974-1975.
- (25) R.D. WEI, H.K. SCHNOES, P.A. HART et F.M. STRONG
The structure of PR Toxin, a mycotoxin from *Penicillium Roquefo*
Tetrahedron 31, 109, 1975.
- (26) F. BAERT, M. FOULON, G. ODOU et S. MOREAU
The crystal structure and absolute configuration of the PR toxin
Acta. Cryst., à paraître.
- (27) A.A. NEWMAN
Chemistry of Terpenes and terpenoids
Academic Press., London and Newy-York, 1972.
- (28) K.H. OVERTON et J.S. ROBERTS
Terpenoids and Steroids
Specialist Periodical Reports, London 1, 101, 1971.
- (29) G. SNATZKE
Circulardichroïsmes-IX, modifizierung der octantenregel für
 α, β ungesättigte ketone : transoide enone
Tetrahedron 21, 421, 1965.
- (30) P. CRABBE
Applications de la dispersion rotatoire optique et du dichroïsm
circulaire optique en chimie organique
Gauthier-Villars, paris, 1968, p. 492.
- (31) J.H. NOGGLE et R.E. SCHIRMER
The nuclear Overhauser effect
Academic Press, New York and London 1971.

- (32) B.J. HOPKINS et G.W. PEROLD
(S)-2-Hydroxycyparene (p-(1,2,2-Trimethylcyclopentyl)-0-cresol)
and 3,4'-Ethylenebisphenol from a Liverwort, *Marchantia polymorpha* Linn.
J.C.S. Perkin I, 32, 1974.
- (33) Y. ASAKAWA, J.C. MULLER, G. OURISSON et G. DUCOMBS
Nouvelles lactones sesquiterpéniques de *Fruallania (hepaticae)*.
Isolement, structures, propriétés allergisantes.
Bull. Soc. Chim. 1465, 1976.
- (34) a) N.H. ANDERSEN, B. SHUNK et C.R. COSTIN
(+)- α -Selinene and enantiomeric eudesmane from *chiloscyphus polyanthus* (L.) corda
Experientia 29, 645, 1973.
- b) N.H. ANDERSEN
Biogenetic implications of the antipodal sesquiterpenes of
vetiver oil
Phytochemistry 9, 145, 1970.
- (35) H. KNOCHE, G. OURISSON, G.W. PEROLD, J. FOUSSEREAU et
J. MALEVILLE
Allergenic Component from the Liverwort : A sesquiterpenelactone
Sciences 166, 239, 1969.
- (36) K. FREGRI et L. Van der PIJL
Principles of Pollination Ecology
Pergamon Press, Oxford 1971.
- (37) J.B. HARBONE
Introduction to ecological biochemistry
Academic Press, London, New York, Sans Francisco 1977.
- (38) W.S. BOWERS, CHIKAO NISHINO, M.E. MONTGOMERY, L.R. NAULT et
M.W. NIELSON
Sesquiterpene progenitor, Germacrene A : an alarm pheromone
in Aphids.
Sciences 196, 680, 1977.

- (39) M. LUCKNER
Secondary metabolism in plants and animals
Chapman and Hall 1972.
- (40) A. CIEGLER, S. KADIS et S. AJL
Microbial Toxines. Vol. VI fungal toxines
Academic Press, New York and London, 1971.
- (41) D.V. BANTHORPE, B.V. CHARLWOOD, M.J.O. FRANCIS
The biosynthesis of monoterpenes
Chemical Reviews 72, 116, 1972.
- (42) K. CLIFFORD, J.W. CORNFORTH, R. MALLABY et G.T. PHILLIPS
Stereochemistry of isopentenyl pyrophosphate Isomerase
Chem. Comm. 1599, 1971.
- (43) W. PARKER, J.S. ROBERTS, R. RAMAGE
Sesquiterpene biogenesis
Quart. Rev. 21, 331, 1967.
- (44) T.K. DEVON et A.I. SCOTT
Naturally occurring compounds, vol. II, terpens
Academic Press, New York and London 1972.
- (45) J.B. HENDRICKSON
Stereochemical implications in sesquiterpene biogenesis
Tetrahedron 7, 82, 1959.
- (46) D.F. Mac. SWEENEY, R. RAMAGE et A. SATTAR
Biogenetic relationships of the vetiver sesquiterpenes
Tetrahedron Letters 557, 1970.
- (47) C.J.W. BROOKS et R.A.B. KEATES
Biosynthesis of Petasin
Phytochemistry 11, 3235, 1972.
- (48) D.J. DUNHAM et R.G. LAWTON
Spiro intermediates in sesquiterpene rearrangements and synthe
J. Amer. Chem. Soc. 93, 2075, 1971.

- (49) F.C. BAKER, C.J.W. BROOKS et S.A. HUTCHINSON
Biosynthesis of capsidiol in sweet Peppers (*capsicum frutescenes*)
Infected with fungi : evidence for methyl group migration from
 ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
J.C.S. Chem. Comm. 293, 1975.
- (50) W.B. TURNER
Fungal metabolites
Academic Press, New York and London, 1971.
- (51) P.S. STEYN, R. VLEGGAR et P.L. WESSELS
Biosynthesis of Versiconal acetate, Versiconal Acetate and
Versiconal, the role of Versiconal Acetate in Aflatowin Bio-
synthesis
J. Chem. Soc. Perkin I , 460, 1979.
- (52) A.L. LEHNINGER
Biochimie
Flammarion, médecine, Science 1972.
- (53) K. DECKER et C. BARTH
Compartmentation of the early steps of cholesterol biosynthesis
in mammalian liver
Molecular and Cellular Biochemistry 2, 179, 1973.
- (54) P.M. SCOTT et S.R. KANHERE
Instability of PR Toxin in blue cheese
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 141, 1979.
- (55) R.E. LONDON, W.H. KOLLMAN et N.A. MATWIYOFF
The quantitative analysis of carbon-carbon coupling in ^{13}C
Nuclear Magnetic Resonance spectra of molecules biosynthesized
from ^{13}C enriched precursors
J. Amer. Chem. Soc. 97, 3565
- (56) D.E. HATHWAY, S.S. BROWN, L.F. CHASSEAUD et D.H. HUTSON
Foreign compounds metabolism in mammals
Chem. Soc. Specialist. Periodical. Reports, London 1, 314, 1970.

- (57) S. TRIPETT
The wittig reaction
Quart. Rev. XVII, 406, 1963.
- (58) G. GALLAGHER et R.L. WEBB
Tetrastituted Acrylates : the Wittig-Horner reaction of
ketones with triethyl α -phosphonopropionate
Synthesis 122, 1974.
- (59) a) R.C. GARNER, E.C. MILLER et J.A. MILLER
Liver microsomal metabolism of aflatoxin B₁ to a reactive
derivation toxic to Salmonella typhimurium TA 1530
Cancer. Res. 32, 2058, 1972.
- b) R. SCHOENTAL
Heptotoxic activity of retrorsine, senkukine and hydroxy-
senkukine in newborn rats and the role of epoxydes in car-
cinogenesis by purrolizidine alkaloids and aflatoxins
Nature 227, 401, 1970.
- c) C.N. MARTIN et R.C. GARNER
Aflatoxin B-oxide generated by chemical or enzymic oxidatio
of aflatoxin B₁ causes guanine substitution in nucleic aci
Nature 267, 863, 1977.
- (60) a) A. KAPPAS et A.P. ALVARES
How the liver metabolizes foreign substances
Scientific American 232, 22, 1975.
- b) J.R. GILLETTE, D.C. DAVIS et M.A. SASAME
Cytochrome P 450 and its rol in drug metabolism
Ann. Biol Chim. 33, 399, 1975
34, 1, 1976.
- (61) H. REMMER et H.J. MERKER
Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reti-
culum and drug metabolizing enzymes
Science 142, 1657, 1963.

- (62) D.S.P. PATTERSON et B.A. ROBERTS
The *in vitro* reduction of aflatoxins B₁ and B₂ by soluble avian liver enzymes
Food Cosmet. Toxicol 9, 829, 1971.
- (63) Y. UENO
Mode of action of trichothecenes
Ann. Nutr. Alim. 31, 885, 1977.
- (64) M. CACAN, S. MOREAU et R. TAILLEZ
Etude *in vitro* de la glucuronoconjugaison de la toxine du *Penicillium roqueforti* (PRT) et de ses métabolites associés
Biochimie 60, 685, 1978.
- (65) C. AUJARD, E. MOREL-CHANY, C. ICARD et G. TRINGAL
Effects of PR Toxin on liver cells in culture
Toxicology 12, 313, 1979.
- (66) Y. MOULE, M. JEMMALI et N. ROUSSEAU
Mechanism of the inhibition of transcription by PR Toxin a mycotoxin from *penicillium roqueforti*
Chem. Biol. Interactions 14, 207, 1976.
- (67) Y. MOULE, M. JEMMALI et N. DARRACQ
Inhibition of protein synthesis by PR Toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*
FEBS Letters 88, 341, 1978.
- (68) a) P. ALEXANDER et H. MOROSON
Cross-linking of deoxyribonucleic acid to protein following ultra-violet irradiation of different cells
Nature 194, 882, 1962.
- b) D. BRUTLAG, C. SCHLEHUBER et J. BONNER
Properties of formaldehyde treated nucleohistone
Biochemistry 8, 3214, 1969.

- c) N. MAGANA-SCHWENKE et B. EKERT
Biochemical analysis of damage induced in yeast by formaldehyde. Induction of cross-links between DNA and protein
Mutation Res. 51, 11, 1978.
- (69) M. Ya FELDMAN
Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde
Progress in nucleic acid research and molecular biology
Academic Press, New York 1973, 13, 1-49.
- (70) H. SALEM et H. CULLUMBINE
Inhalation Toxicities of some aldehydes
Toxic and App. Pharmacol. 2, 183, 1960.
- (71) a) M.P. SHUBERT
Compounds of thiol acids with aldehydes
J. Biol. Chem. 114, 341, 1936.
b) S. RATNER et H.T. CLARKE
The action of formaldehyde upon cysteine
J. Amer. Chem. Soc. 59, 200, 1937.
- (72) L. LORETI, M.E. FERIOLI, G.C. GAZZOLA et G.G. GUIDOTTI
Studies on the anti-tumor activity of aliphatic aldehydes III
formation of thiazoidin 4. Carboxylic acids in tissues
Eur. J. Cancer. 7, 281, 1971.
- (73) H. ESTERBAUER, A. ERTL et N. SCHOLZ
The reaction of cysteine with α,β insaturated aldehydes
Tetrahedron 32, 285, 1976.
- (74) E. CIARANFI, L. LORETI, A. BORGHETTI et G.G. GUIDOTTI
Studies on the anti-tumor activity of aliphatic aldehyde
Eur. J. Cancer. 1, 147, 1965.
- (75) L. POLONELLI, G. MORACE, F. DELLEMONACHE et R.A. SAMSON
Studies on the PR Toxin of *Penicillium roqueforti*
Mycopathological. 66, 99, 1978.

- (76) M.T. PIVA, J. GUIRAUD, J. CROUZET et P. GALZY
Influence des conditions de culture sur l'excrétion d'une
mycotoxine par quelques souches de *Penicillium roqueforti*
Le Lait LVI, 397, 1976.
- (77) C. RICHE, C. PASCARD-BILLY, M. DEVYS, A. GAUDEMER, M. BARBIER
et J.F. BOUSQUET
Structure cristalline et moléculaire de la phoménone phytotoxine
produite par le champignon *phana exegea var non oxydabilis*
Tetrahedron Letters 2765, 1974.
- (78) S. MOREAU, A. GAUDEMER, A. LABLACHE-COMBIER et J. BIGUET
Métabolites de *P. roqueforti* : PR Toxine et métabolites associés
Tetrahedron Letters 833, 1976.
- (79) B. ARNOUX, C. PASCARD et S. MOREAU
Eremofortin D, a Valencane-clan sesquiterpene
Acta. Cryst. B 33, 2930, 1977.
- (80) W. REUSCH et C.K. JOHNSON
The pulegone oxides
J. Org. Chem., 28, 2557, 1963.
- (81) G.P. ARSENAULT, J.R. ALTHAUS et P.V. DIVEKAR
Structure of the antibiotic Brotryodiplodin. Use of chemical
ionisation mass spectrometry in organic structure determination
Chem. Comm. 1414, 1969.

